

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Взаимодействие факторов
окружающей среды и генетического
полиморфизма в этиологии
злокачественных опухолей*

*Генетические и эпигенетические
механизмы регуляции вирусов
папиллом человека*

*Опухолевые стволовые клетки
мультиформной глиобластомы*

*Новые системы доставки
противоопухолевых препаратов
на основе наночастиц нитрида бора*

*Высококочувствительное
сканирование генных мутаций*

ТОМ 3 № 2
2016

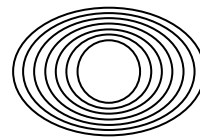


С 2014 г. журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Якубовская Марианна Геннадиевна, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гудкова Маргарита Владимировна, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

2^{ТОМ 3}
'16

Учредители:
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»,
Минздрава России;
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Статьи направлять по адресу:
adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор В.А. Наумкина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору

в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014 г.)

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.
Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.
В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.
2016. Том 3. № 2. 1–60

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Тверской печатный двор»
Тираж 1000 экз.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории методов скрининга канцерогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

Глушанкова Наталья Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, руководитель отдела опухолевого роста ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Казанский Дмитрий Борисович, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карпухин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

Кжышковска Юлия Георгиевна, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейм университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующая отделением научного планирования и подготовки кадров ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией механизмов прогрессии эпителиальных опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., заведующий лабораторией биохимии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Миркин Сергей Моисеевич, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель отделения прогноза Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Минздрава России — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр», заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель начальника Управления по взаимодействию с РАН, ответственный секретарь Научно-координационного совета Федерального агентства научных организаций России (Москва, Россия)

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии ФГБУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (Томск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Васильев Юрий Маркович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, вице-президент Общества клеточной биологии РАН (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, главный онколог Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Зарилзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

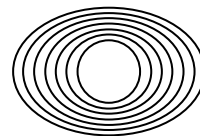
Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Since 2014, the journal "Advances in Molecular Oncology" was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



**N.N. Blokhin Russian
Cancer Research Center,
Ministry of Health of Russia**

Online version of the journal
is available at:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zhorovskaya Irina B., PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Yakubovskaya Marianna G., PhD, DSc, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Gudkova Margarita V., PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2014

2 Vol. 3
'16

Founders:

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Articles should be sent to e-mail:
adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova

Proofreader V.A. Naumkina

Designer E.V. Stepanova

Maker-up O.V. Goncharuk

Subscription & Distribution Service

I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager R.A. Kuznetsov,

+7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

The journal was registered
at the Federal Service for Surveillance
of Communications, Information

Technologies, and Mass Media

(III No. ФС77-57560

dated 08 April 2014).

If materials are reprinted in whole
or in part, reference must necessarily
be made to the journal "Uspekhi
molekulyarnoy onkologii".

The editorial board is not responsible
for advertising content.

The authors, point of view given
in the articles may not coincide with
the opinion of the editorial board.

ISSN: 2313-805X (Print)

ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2016. Vol. 3. No. 2. 1–60

© PH "ABV-Press", 2016

Pressa Rossii catalogue index:
93562

Printed at the Tverskoy Pechatny
Dvor

1,000 copies

EDITORIAL BOARD

- Belitsky Gennady A.**, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Berstein Lev M.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)
- Bozhenko Vladimir K.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Gloushankova Natalia A.**, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Gurtsevitch Vladimir E.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Imyanitov Eugeny N.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Tumor Growth of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)
- Kazansky Dmitry B.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Karpukhin Aleksander V.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)
- Kzhyskovska Juliya G.**, PhD, DSc, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)
- Kubasova Irina Yu.**, PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Kushlinskii Nikolay E.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry of the Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Lazarevich Natalia L.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Epithelial Tumors Progress Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Lichtenstein Anatoly V.**, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Tumors Biochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Mazurenko Natalia N.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Mirkin Sergey M.**, Professor, White Family Department of Biology, Chair in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)
- Sergeeva Natalia S.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics Department of the P.A. Herzen Moscow Scientific and Research Cancer Institute of the Ministry of Health of Russia – a branch of National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Stepanova Evgenia V.**, MD, DSc, Deputy Head of the Department for Interaction with the RAS, Secretary in Charge of the Scientific Coordination Council of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia, (Moscow, Russia)
- Tjulandin Sergey A.**, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Research Work of the Research Institute of Clinical Oncology of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Tchevkina Elena M.**, PhD, DSc, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Tcherdyntseva Nadezhda V.**, PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

- Vasiliev Yuri M.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Chief Researcher of Research Institute of Carcinogenesis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Vice President of the Cell Biology Society of the RAS (Moscow, Russia)
- Gudkov Andrey V.**, PhD, DSc, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Chair of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)
- Davydov Mikhail I.**, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Chief Oncologist of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Zaridze David G.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Kopnin Boris P.**, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)



Белые Ночи

22-24 июня, 2016

Санкт-Петербург

II ПЕТЕРБУРГСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ «БЕЛЫЕ НОЧИ – 2016»



В 2016 году Форум «Белые ночи» делает акцент на обновлённом интерактивном формате представления и обсуждения современных подходов к диагностике, хирургическому, лекарственному и лучевому лечению больных онкологическими заболеваниями различных локализаций, следуя лучшим мировым практикам медицинских конгрессов.

Параллельно основной работе пленарных и лекционных залов на форуме будет больше онлайн трансляций «живой хирургии», телемостов, клинических разборов, обсуждений, круглых столов, дискуссий, тренингов, мастер-классов, семинаров, курсов и др.

У всех участников Форума будет возможность пройти цикл повышения квалификации по теме: «Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний» и получить удостоверение государственного образца.

По завершении Форума все официальные участники смогут получить сборник научных материалов.

Ориентировочное количество участников: свыше 2000 врачей-онкологов и специалистов смежных специальностей, в том числе: химиотерапевты, специалисты лучевой диагностики и терапии.

Специальные курсы:

- Курс УЗ диагностики заболеваний молочных желез совместно с IBUS Breast Imaging School (www.ibus.org)
- Школа научных исследований в онкологии совместно с School of Health Sciences (University of Tampere), College of Public Health (Taiwan University) и др.

Подробнее: www.forum-onco.ru

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Д.Г. Заридзе, А.Ф. Мукерия, О.В. Шаньгина

**Взаимодействие факторов окружающей среды и генетического полиморфизма
в этиологии злокачественных опухолей 8**

С.В. Винокурова

Генетические и эпигенетические механизмы регуляции вирусов папиллом человека. 18

З.Н. Никифорова, И.А. Кудрявцев, Н.Е. Арноцкая, И.С. Брюховецкий, В.Е. Шевченко

Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы 26

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*И.Ю. Житняк, И.В. Сухорукова, А.М. Ковальский, А.Т. Матвеев, И.Н. Бычков,
Д.В. Штанский, Н.А. Глушанкова*

Изучение новых систем доставки противоопухолевых препаратов на основе наночастиц нитрида бора 34

*И.В. Ботезату, И.О. Панчук, А.М. Строганова, А.И. Сендерович, В.Н. Кондратова,
В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн*

**Высококчувствительное сканирование генов мутаций:
зонды TaqMan как блокирующие агенты. 42**

*В.Е. Шевченко, С.В. Ковалев, Н.Е. Арноцкая, З.Н. Никифорова,
И.А. Кудрявцев, Е.А. Савченко, И.С. Брюховецкий*

**Молекулярные детерминанты действия трансформирующего фактора роста бета-1
на клетки глиобластомы человека. 50**

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 60

REVIEWS

D.G. Zaridze, A.F. Mukeriya, O.V. Shan'gina

Interaction of environmental factors and genetic polymorphism in the etiology of cancer 8

S.V. Vinokurova

Genetic and epigenetic mechanisms of regulation of human papillomavirus 18

Z.N. Nikiforova, I.A. Kudryavtsev, N.E. Arnotskaya, I.S. Bryukhovetskiy, V.E. Shevchenko

Tumor stem cells from glioblastoma multiforme 26

EXPERIMENTAL REPORTS

I.Yu. Zhitnyak, I.V. Sukhorukova, A.M. Koval'skiy, A.T. Matveev,

I.N. Bychkov, D.V. Shtanskiy, N.A. Glushankova

The study of new anticancer drug delivery system based on the boron nitride nanoparticles 34

I.V. Botezatu, I.O. Panchuk, A.M. Stroganova, A.I. Senderovich,

V.N. Kondratova, V.P. Shelepov, A.V. Lichtenshtein

Highly sensitive scanning of gene mutations: TaqMan probes as blocking agents. 42

V.E. Shevchenko, S.V. Kovalev, N.E. Arnotskaya, Z.N. Nikiforova,

I.A. Kudryavtsev, E.A. Savchenko, I.S. Bryukhovetskiy

Molecular determinants of transforming growth factor beta-1 action on human glioblastoma cells 50

INFORMATION FOR AUTHORS 60

Взаимодействие факторов окружающей среды и генетического полиморфизма в этиологии злокачественных опухолей

Д.Г. Заридзе, А.Ф. Мукерия, О.В. Шаньгина

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Давид Георгиевич Заридзе dgzaridze@crc.umos.ru

Доминирующую роль в этиологии злокачественных опухолей играют факторы окружающей среды и образа жизни человека. В то же время индивидуальный риск развития рака определяется генетической предрасположенностью.

Вопросу влияния генетического полиморфизма на риск развития опухолей посвящено множество работ. Однако их результаты разочаровывают. Главной проблемой этих исследований является небольшое количество наблюдений. Кроме того, во многих работах не учитывалась информация о факторах окружающей среды и образа жизни пробандов.

Метод случай—контроль — основной эпидемиологический метод изучения генетических вариантов, влияющих на риск развития рака. Для выявления часто встречающихся вариантов, влияние которых на риск невелико, необходимы большие выборки больных и контрольной группы. В связи с этим многоцентровое исследование — принятый метод в области молекулярной эпидемиологии. В настоящем обзоре представлены результаты многоцентровых молекулярно-эпидемиологических исследований, проведенных в отделении эпидемиологии НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина совместно с коллегами из стран Центральной и Восточной Европы (Венгрия, Польша, Румыния, Словакия). Исследование координировало Международное агентство по изучению рака (Лион, Франция). Работы, включенные в обзор, посвящены изучению роли полиморфизма генов II фазы метаболизма ксенобиотиков (GSTM1 и GSTT1), алкогольдегидрогеназы (ADH1B и ADH1C) и альдегиддегидрогеназы (ALDH2), метаболизма солей фолиевой кислоты — метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и тимидилатсинтетазы (TYMS) и гена CHECK2 в этиологии рака легкого, верхних дыхательных и пищеварительных органов и почки.

Анализ проведенных исследований позволяет заключить, что генетический полиморфизм модифицирует риск развития рака в результате экспозиции к тому или иному внешнему фактору. Показатель Р, который характеризует взаимодействие (интеракцию) между влиянием фактора окружающей среды и определенным генотипом и риском развития рака, часто имеет статистически достоверное значение. Таким образом, большинство спонтанных опухолей человека развиваются в результате взаимодействия генетического полиморфизма и внешних факторов.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, фактор окружающей среды, интеракция, этиология злокачественных опухолей

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-8-17

Interaction of environmental factors and genetic polymorphism in the etiology of cancer

D.G. Zaridze, A.F. Mukeriya, O.V. Shan'gina

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Environmental and lifestyle factors play a dominant role in etiology of cancer. In addition, genetic factors significantly influence interindividual variation in cancer incidence. The epidemiological studies in which effects of genetic polymorphism on the risk of cancer have been elucidated are somewhat disappointing. An important problem of these studies is their size. Moreover some of them do not have information on life-style and environmental exposures.

The epidemiological method used to investigate the effect of genetic polymorphism on cancer risk is a retrospective case-control study. The chance of discovery of the specific «frequent» allelic variant which is associated with small increase in the risk is higher in studies including large numbers of cases and controls.

This paper reviews the epidemiologic studies conducted in Department of epidemiology (Institute of carcinogenesis, Russian N.N. Blokhin Cancer Research Centre) in cooperation with countries of Central and Eastern Europe (Hungary, Poland, Romania, Slovakia) and coordinated by the International Agency for Research on Cancer (IARC). We will cover the studies, in which an attempt has been made to investigate the interaction between polymorphisms of phase 2 xenobiotic metabolism genes (GST), alcohol and aldehyde-metabolizing genes (ADH, ALDH), folate metabolism genes (MTHFR, TYMS) and CHECK2 with environmental and life-style factors in etiology of cancers of the lung, kidney and upper aerodigestive tract. The analyses of these studies suggest that genetic polymorphism modifies the effect of environmental exposures (including occupational carcinogens) and life-style factors (including tobacco, alcohol and diet) on the risk of cancer. The risk of cancer associated with known carcinogenic exposure may increase or decrease depending on the genotype. Interaction between exposure to carcinogenic factor and genotype is a major and significant determinant of cancer risk. Spontaneous tumors develop as a result of a combined effect of environmental factors and genetic polymorphism or endogenous and exogenous factors.

Key words: genetic polymorphism, environmental factor, interaction, etiology of malignant tumors

Введение

Доминирующую роль в этиологии злокачественных опухолей играют факторы окружающей среды и образа жизни человека (курение, избыточная масса тела, низкая физическая активность, инфекционные заболевания, употребление алкоголя, экзогенные гормоны, репродуктивные факторы, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, канцерогенные вещества). Однако индивидуальный риск развития рака определяется генетической предрасположенностью [1].

Наследование генов с высокопенетрантными мутациями приводит к высокому риску развития злокачественных опухолей. К таким генам относятся: ген ретинобластомы *Rb*, при герминальных мутациях которого развивается врожденная форма ретинобластомы; ген-супрессор *p53*, мутации которого являются причиной синдрома первично-множественных опухолей Ли–Фраумени; гены рака молочной железы *BRCA1* и *BRCA2*, наследуемые повреждения которых повышают риск развития не только рака молочной железы и рака яичников, но и ряда других форм рака; ген аденоматозного полипоза толстой кишки *APC*; ген непוליозного врожденного рака толстой кишки *HMLH1*, ген нейрофиброматоза *NF1* и др. Относительный риск (ОР) развития того или иного опухолевого синдрома у людей с врожденными мутациями очень велик, а в ряде случаев вероятность развития рака достигает 100 %. Однако частота встречаемости врожденных мутаций крайне низка (1–5 случаев на 10 тыс. младенцев). Соответственно, низка (< 5 %) и доля злокачественных опухолей, этиологически связанных с подобными генетическими событиями. Экзогенные факторы на риск развития этих опухолей практически не влияют [2].

В то же время низкопенетрантный генетический полиморфизм встречается часто. Риск развития рака, связанный с этим типом наследственности, невысокий. Однако большинство спонтанных опухолей развиваются в результате комбинированного влияния наследственности и внешних факторов [3].

Результаты молекулярно-эпидемиологических исследований свидетельствуют о наличии связи между полиморфизмом генов, регулирующих метаболизм канцерогенных веществ, клеточный цикл, репарацию ДНК, воспаление и другие ключевые процессы, и риском развития рака [4].

При отсутствии экспозиции к канцерогенному фактору окружающей среды наличие или отсутствие генетической предрасположенности не влияет на риск развития злокачественных опухолей. В то же время при наличии экспозиции к канцерогенному фактору генетическая предрасположенность может влиять на риск развития рака и модифицировать его. Степень взаимодействия между генами, регулирующими метаболизм, и внешними факторами зависит от «дозы» канцерогенного фактора. Для одних генов интеракция более выражена при низких «дозах» канцерогенного

воздействия, для других — при высоких; причем с увеличением «дозы» растет степень выраженности интеракции (соотношение доза–эффект) [5].

В первую очередь на предрасположенность к развитию рака влияют гены ферментов семейства цитохромов 450 (*CYP*). Ферменты I фазы (цитохромы P450) активизируют проканцерогены (полициклические ароматические углеводороды, гетероциклические амины, афлатоксины, нитрозамины и др.) в канцерогенные вещества, ферменты II фазы детоксицируют и удаляют их из организма. Активные метаболиты разрушаются в основном в результате взаимодействия с ферментами глутатион-S-трансферазы (glutathione S-transferases, GST). Стационарная концентрация активных метаболитов определяет возможность трансформации клетки и развития опухоли. Существует множество изоформ цитохрома P450, определяющих активацию и дезактивацию тех или иных ксенобиотиков. Канцерогенный эффект — результат взаимодействия метаболических процессов, ведущих к активации или детоксикации канцерогенных веществ [3].

Ассоциации между полиморфизмом метаболических генов I и II фаз и риском развития опухолей, индуцированных курением, посвящены 2 научных аналитических обзора [5, 6]. На основании этих работ можно сделать вывод о том, что главной проблемой изучения влияния полиморфизма метаболических генов на риск развития болезни является то, что индивиды с «неблагоприятным» полиморфизмом встречаются редко, и в связи с этим эпидемиологические исследования должны включать большие выборки участников. Во многих работах также не учитывалась информация о факторах окружающей среды и образа жизни пробандов.

Наиболее стабильные результаты исследований относились к полиморфизму генов *NAT1* и *NAT2*. Практически во всех исследованиях, в которых была обнаружена связь между риском развития рака мочевого пузыря и скоростью ацетилирования, показана достоверная связь между аллельными вариантами *NAT1* и *NAT2* и риском развития рака мочевого пузыря [7], легкого [8] и опухолями верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО) [9]. Отметим, что в этих работах были исследованы большие выборки больных. В частности, в эпидемиологическое исследование J.D. McKey и соавт. были включены 2250 больных раком легкого, 811 пациентов с раком ВДПО и 2700 лиц контрольной группы [9]. Проведено генотипирование нескольких групп генов I и II фаз метаболизма ксенобиотиков, из которых гены *NAT1* и *NAT2* оказались наиболее значимыми с точки зрения их влияния на риск развития злокачественных опухолей.

В настоящем обзоре представлены результаты многоцентровых молекулярно-эпидемиологических исследований рака легкого, ВДПО и почки, проведенных в отделении эпидемиологии НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина совместно с коллегами из стран Центральной и Восточной Европы (Венгрия,

Польша, Румыния, Словакия). Исследование координировало Международное агентство по изучению рака (Лион, Франция).

Метод случай—контроль — основной эпидемиологический метод изучения генетических вариантов, влияющих на риск развития рака. Размер выборки (больных и контрольной группы) имеет решающее значение, поскольку вероятность обнаружения часто встречающегося генетического варианта с выраженным эффектом риска развития рака крайне низка. В связи с этим многоцентровые исследования являются принятым методом в области молекулярной эпидемиологии.

Полиморфизм генов глутатион-S-трансферазы и риск развития рака

Ферменты GST вовлечены во II фазу метаболизма ксенобиотиков, в процессе которой канцерогенные вещества трансформируются в гидрофильные соединения и выводятся из организма. Индивиды с гомозиготной делецией в генах *GSTM1* и *GSTT1* не продуцируют соответствующих ферментов. Отсутствие этих ферментов потенциально может увеличивать восприимчивость к злокачественным опухолям в результате снижения эффективности детоксикации канцерогенных веществ. Таким образом, индивиды с нулевым генотипом *GSTT1* и *GTM1* могут быть более чувствительными к генотоксическому влиянию ксенобиотиков и других токсикантов, чем индивиды с активным генотипом. С другой стороны, реакции, катализируемые *GSTT1* и *GTM1*, повышают токсичность некоторых соединений, например галогенизированных пестицидов. GST также связывают изотиоцианаты (ИЦ), которые являются мощными индукторами ферментов, принимающих участие в детоксикации мутагенных веществ. В результате антиканцерогенный потенциал ИЦ снижается [10, 11].

Нулевой генотип *GSTM1* встречается у 30–50 % населения европеоидной расы, например, у 50 % жителей Испании [7]. Нулевой генотип *GSTT1* чаще встречается в Азии (50–60 %) и относительно редко среди людей европейского происхождения (20–30 %) [11].

Пестициды, образуемые из галогенизированных алканов, алкенов и других растворителей, проходят биоактивацию в почке после соединения с GST. В результате образуется реактивный глутатион-конъюгат, который для галогенизированных веществ служит субстратом для последующей ферментативной реакции с образованием реактивных хлоротиокетенов, повреждающих почку. Таким образом, для ферментативных реакций, ведущих к образованию реактивных соединений, непосредственно повреждающих почку, необходимы активные формы GST. В противном случае, с образованием неактивного фермента, метаболизм галогенизированных соединений будет проходить путем окисления, без образования реактивных веществ, повреждающих почку [12, 13].

Влияние генотипа *GST* и экспозиции к пестицидам на рабочем месте на риск развития почечно-клеточного рака (ПКР) подтверждено в проведенном нами эпидемиологическом исследовании, в которое были включены 1097 больных ПКР и 1476 лиц контрольной группы [14]. Выявлено, что у индивидов, когда-либо экспонированных к пестицидам, повышен риск развития ПКР (относительный риск (ОР) 1,82; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,10–3,00). Риск статистически достоверно возрастал в зависимости от продолжительности экспозиции и кумулятивной дозы. После корректировки по генотипу достоверное повышение риска было отмечено у лиц, экспонированных к пестицидам с активным генотипом *GSTM1* (ОР 4,00; 95 % ДИ 1,55–10,33), по сравнению с неэкспонированными носителями активных аллелей (ОР 0,99; 95 % ДИ 0,80–1,23) и с индивидами, экспонированными к пестицидам, но имеющими нулевой генотип (ОР 1,03; 95 % ДИ 0,50–2,14) (Р интеракции 0,04). Риск был статистически достоверно увеличен и у лиц, экспонированных к пестицидам с активным вариантом гена *GSTT1* (ОР 2,28; 95 % ДИ 1,11–4,67). У экспонированных к пестицидам носителей активных аллелей обоих генов (*GSTM1* и *GSTT1*) риск был повышен в 6 раз по сравнению с неэкспонированными, но с нулевым генотипом хотя бы одного гена (ОР 6,47; 95 % ДИ 1,82–23,00) (Р интеракции 0,02) (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у носителей активных аллелей *GSTM1* и *GSTT1*, подвергшихся воздействию пестицидов на рабочем месте, риск развития ПКР достоверно повышен по сравнению с теми, кто не был подвержен влиянию этих веществ. Среди индивидов, экспонированных к пестицидам с нулевым генотипом *GSTM1* и *GSTT1*, повышенного риска выявлено не было.

Также в этом исследовании было проанализировано действие полиморфизма *GST* на риск развития ПКР в зависимости от наличия профессиональной экспозиции к трихлорэтилену (ТХЭ). Риск достоверно повышался при всех уровнях экспозиции к ТХЭ. Однако после стратификации по генотипу *GSTT1* выраженная связь рака почки с экспозицией к ТХЭ отмечена только у носителей активных аллелей, экспонированных к ТХЭ (ОР 1,88; 95 % ДИ 1,06–3,33) по сравнению с носителями нулевого генотипа (ОР 0,93; 95 % ДИ 0,35–2,44). Риск возрастал с ростом длительности и дозы экспозиции. Риск развития ПКР не был повышен среди носителей активных аллелей *GSTT1*, но не экспонированных к ТХЭ [15].

Потребление крестоцветных овощей (кочанная капуста, цветная капуста, кольраби, брюссельская капуста, брокколи) снижает риск развития некоторых злокачественных опухолей, в частности рака легкого и почки [16]. Эти овощи богаты ИЦ, которые в экспериментах *in vivo* показали химиопрофилактический эффект [17]. Полагают, что ИЦ удаляются из клеток ферментами *GSTM1* и *GSTT1*, которые в гомозигот-

ном состоянии сообщают клеткам нулевой генотип. При этом генотипе фермент не продуцируется. У индивидов, гомозиготных по одному или обоим генам, концентрации ИЦ должны быть высокие. Соответственно, у индивидов с нулевым генотипом *GSTM1*, который встречается у 45–55 % населения европеоидной расы, протективный эффект крестоцветных овощей должен быть более выражен, чем у носителей «дикого» генотипа [18, 19].

Результаты эпидемиологического исследования рака легкого подтвердили химиопрофилактический эффект ИЦ, показав, что риск развития заболевания статистически достоверно снижен у лиц с высоким потреблением крестоцветных овощей (ОР 0,78; 95 % ДИ 0,64–0,96). После стратификации по генотипу было выявлено, что протективный эффект имеет место только у индивидов с нулевыми аллелями *GSTM1* (ОР 0,67; 95 % ДИ 0,49–0,91) и *GSTT1* (ОР 0,63; 95 % ДИ 0,37–1,07). Протективный эффект наиболее выражен у носителей нулевых вариантов обоих генов (ОР 0,28; 95 % ДИ 0,11–0,67) и, соответственно, у лиц с низким уровнем или отсутствием ферментов в циркуляции (табл. 2). Величина Р, характеризующая взаимодействие между нулевым генотипом *GSTM1/GSTT1* и потреблением крестоцветных овощей, статистически достоверна (Р интеракции 0,03).

После стратификации участников исследования в зависимости от статуса курения (курящие/некурящие) было выявлено, что у некурящих риск развития рака легкого, связанный с потреблением крестоцветных овощей, не зависит от генотипа. В то же время, среди курящих с нулевым генотипом *GSTM1* статистически значимое снижение риска отмечено у лиц с высоким (ОР 0,70; 95 % ДИ 0,50–0,96; Р 0,03) или средним (ОР 0,68; 95 % ДИ 0,48–0,96; Р 0,03) уровнями потребления крестоцветных овощей. Протективный эффект крестоцветных овощей отсутствовал у индивидов с активными аллелями *GSTM* и *GSTT*. Максимальный защитный эффект крестоцветных овощей отмечали среди курящих лиц с нулевыми вариантами обоих генов: у индивидов с нулевыми *GSTM1/GSTT1* как со средним (ОР 0,30; 95 % ДИ 0,11–0,81; Р 0,02), так и с высоким (ОР 0,31; 95 % ДИ 0,12–0,82; Р 0,02) уровнями потребления овощей риск развития рака легкого был снижен (табл. 3).

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1* влияет на риск развития рака легкого у курящих лиц с низким содержанием крестоцветных овощей в рационе. Можно предположить, что причиной такого взаимодействия является повышенный уровень ферментов GST, вызванный присутствующими в циркуляции химическими компонентами табачного дыма [20].

Для изучения возможной взаимосвязи генетического полиморфизма *GSTM1/GSTT1* и некоторых особенностей питания были проанализированы образцы крови 925 пациентов с ПКР и 1247 лиц контрольной группы [21]. Показано, что у лиц, которые потребляли

недостаточное количество крестоцветных овощей (менее 1 раза в мес), по сравнению с теми, кто потреблял их более 1 раза в нед, риск развития ПКР повышался на 30 % (ОР 1,29; 95 % ДИ 1,02–1,62; Р тренда 0,03). Однако после стратификации по уровню потребления крестоцветных овощей и по генотипу *GSTM1* и *GSTT1* выявлено, что наибольший риск был у лиц, которые мало потребляли крестоцветные овощи, с нулевым вариантом генотипов *GSTT1* (ОР 1,86; 95 % ДИ 1,07–3,23; Р интеракции 0,05) и *GSTM1/GSTT1* (ОР 2,49; 95 % ДИ 1,08–5,77; Р интеракции 0,05). Вариант генотипа *GST* без учета уровня потребления крестоцветных овощей не влиял на риск развития ПКР. Среди курящих повышенный риск развития ПКР был также отмечен у индивидов с нулевыми вариантами генотипов *GSTT1* (ОР 3,42; 95 % ДИ 1,47–7,16) и *GSTT1/GSTM1* (ОР 9,68; 95 % ДИ 1,87–50,1), а также с низким уровнем потребления крестоцветных овощей по сравнению с лицами с высоким уровнем потребления крестоцветных. Показатель интеракции между потреблением крестоцветных овощей и курением среди носителей нулевого генотипа *GSTT1* и *GSTM1* был статистически достоверным (Р 0,02). Среди некурящих потребление овощей не влияло на риск развития ПКР независимо от GST-генотипа.

Результаты подтверждают гипотезу о том, что полиморфизм *GSTM1* и *GSTT1* играет важную роль в развитии рака легкого и почки у лиц, особенно курящих, с низким уровнем потребления крестоцветных.

Полиморфизм генов, алкоголь, альдегиддегидрогеназы и риск развития рака верхних дыхательных и пищеварительных органов

Чрезмерное употребление алкоголя повышает риск развития рака ВДПО (полости рта, гортани, глотки и пищевода) [22, 23]. Механизм канцерогенного действия алкоголя до сих пор неясен. Однако установлено, что ацетальдегид, метаболит алкоголя, является канцерогенным веществом [24], и риск развития рака напрямую зависит от способности отдельного индивида метаболизировать алкоголь, от длительности персистенции ацетальдегида в организме и, соответственно, от длительности его воздействия на организм.

Таким образом, полиморфизм генов, участвующих в метаболизме алкоголя, — основной фактор, влияющий на предрасположенность человека к развитию рака ВДПО.

Алкогольдегидрогеназы (ADHs) — ферменты, катализирующие превращение (окисление) алкоголя в ацетальдегид. Последующее превращение ацетальдегида в «безопасный» и легко выводимый из организма субстрат ацетат катализируется ферментами альдегиддегидрогеназ (ALDHs). Скорость и степень превращения алкоголя с помощью этих 2 ферментов в ацетальдегид и ацетат зависят от полиморфизма соответствующих генов и частоты встречаемости в популяции их редких аллельных вариантов.

Изучена связь между полиморфизмом генов алкогольдегидрогеназы (*ADH1B*, *ADH1C*) и альдегиддегидрогеназы (*ALDH2*) и риском развития рака ВДПО. В исследование были включены 811 больных раком ВДПО и 1083 лица контрольной группы [25]. Показано, что носительство быстро метаболизирующего варианта аллели *ADH1B* R48H снижает риск развития рака ВДПО. Протективный эффект более выражен у умеренно и сильно пьющих (ОР 0,36; 95 % ДИ 0,17–0,77; Р тренда 0,006) по сравнению с непьющими и мало пьющими (ОР 0,57; 95 % ДИ 0,36–0,91; Р тренда 0,018), хотя показатель интеракции Р между уровнем потребления алкоголя и носительством этого варианта гена был статистически недостоверен.

Достоверно повышенный риск развития рака ВДПО наблюдали у лиц, гомозиготных или гетерозиготных по любому варианту аллелей *ALDH2*, причем анализ 3 аллельных вариантов этого гена (*ALDH2* +82, +348 и –261) показал достоверную связь по типу «доза–ответ» ($p = 0,015$; 0,009 и 0,007 соответственно). Кроме того, риск был выше у умеренно и сильно пьющих лиц по сравнению с непьющими и мало пьющими. ОР для каждого гомозиготного варианта у сильно пьющих лиц был равен 4,38 (95 % ДИ 1,32–14,53) для *ALDH2* +82 и 5,79 (95 % ДИ 1,49–22,5) — для *ALDH2* +348 и –261. Интеракция между 2 последними вариантами генов и употреблением алкоголя была статистически достоверна: $p = 0,03$ для *ALDH2* +348 и $p = 0,02$ для *ALDH2* –261 (табл. 4).

Следует отметить, что почти треть участников контрольной группы были гетерозиготными, а 3 % — гомозиготными носителями этих вариантов. Можно предположить, что эти варианты *ADH1B* и *ALDH2* объясняют значительную долю случаев рака ВДПО у лиц, регулярно употребляющих алкоголь. Таким образом, риск развития рака ВДПО определяется полиморфизмом генов *ADH1B* и *ALDH2* и их интеракцией с уровнем потребления алкоголя [25].

В эпидемиологическом исследовании, которое включало 3867 пациентов с раком ВДПО и 2692 лиц

контрольной группы, было выявлено, что полиморфизм генов *ADH1B* (rs1229984) и *ADH7* (rs1573496) снижает риск развития рака ВДПО ($p = 10^{-10}$ и 10^{-10} соответственно). Этот эффект становился более значимым с увеличением уровня потребления алкоголя (Р тренда 0,0002 и 0,065 соответственно). Протективный эффект носительства аллелей rs1229984 гена *ADH1B* не наблюдали у лиц, не употребляющих алкоголь (ОР 1,02; 95 % ДИ 0,66–1,56), в то время как у умеренно и сильно пьющих риск развития рака ВДПО был снижен в 2 раза (ОР 0,42; 95 % ДИ 0,31–0,56; Р тренда 0,0002). Аналогичные результаты получены для rs1573496 гена *ADH7*: риск развития рака ВДПО был снижен на 40 % у сильно пьющих индивидов (ОР 0,64; 95 % ДИ 0,50–0,75; Р тренда 0,065), в то время как у непьющих этот эффект не наблюдался.

Полученные результаты доказывают протективное действие изученных вариантов генов *ADH1B* и *ADH7* против опухолей ВДПО. Кроме того, их эффект в значительной степени зависит от количества употребляемого алкоголя. У непьющих людей полиморфизм этих генов не влияет на риск развития рака, в то время как у пьющих протективное действие проявляется в прямой зависимости от количества употребляемого алкоголя. Более того, нет связи ни одного из этих генов с дозой употребляемого алкоголя у лиц контрольной группы [26].

Известно, что у гетерозиготных носителей аллелей G/A и гомозиготных аллелей A/A rs1229984 (*ADH1B*) скорость метаболизма этанола в 100 и более раз выше, чем у носителей гомозиготных аллелей G/G rs1229984 (*ADH1B*). Это подтверждает гипотезу о том, что быстрая элиминация этанола, приводящая к снижению экспозиции к ацетальдегиду, может сопровождаться защитным эффектом против рака ВДПО.

Гены метаболизма солей фолиевой кислоты, потребление овощей и риск развития рака

В эпидемиологических исследованиях была установлена связь между низким содержанием солей фоли-

Таблица 1. Влияние генотипа *GST* и экспозиции к пестицидам на рабочем месте на риск развития почечно-клеточного рака

Активность генотипа	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1/GSTT1</i>	
	ОР	95 % ДИ	ОР	95 % ДИ	ОР	95 % ДИ
Без экспозиции к пестицидам						
Неактивный (нулевой)*	1,00		1,00		1,00	
Активный**	0,99	0,80–1,23	0,84	0,64–1,10	0,98	0,79–1,22
Экспозиция к пестицидам						
Неактивный (нулевой)*	1,03	0,50–2,14	0,96	0,33–2,73	1,20	0,62–2,33
Активный**	4,00	1,55–10,33	2,28	1,11–4,67	6,47	1,82–23,0
Р интеракции	0,04		0,15		0,02	

Примечание. Здесь и в табл. 2–5: ОР — относительный риск; ДИ — доверительный интервал. *Неактивные аллели. **Активен 1 аллель и более.

Таблица 2. Риск развития рака легкого в зависимости от потребления крестоцветных овощей и GST-статуса

Уровень потребления крестоцветных овощей	ОР (95 % ДИ)	<i>p</i>
Все типы GST		
Низкий	1,00	—
Средний	0,77 (0,62–0,95)	0,0156
Высокий	0,78 (0,64–0,96)	0,0188
Активный GSTM1 (+)		
Низкий	1,00	—
Средний	0,92 (0,68–1,24)	0,5722
Высокий	0,89 (0,67–1,18)	0,4156
Нулевой GSTM1 (–)		
Низкий	1,00	—
Средний	0,65 (0,47–0,89)	0,0072
Высокий	0,67 (0,49–0,91)	0,0092
Активный GSTT1 (+)		
Низкий	1,00	—
Средний	0,80 (0,63–1,01)	0,0631
Высокий	0,83 (0,66–1,03)	0,0940
Нулевой GSTT1 (–)		
Низкий	1,00	—
Средний	0,67 (0,39–1,16)	0,1551
Высокий	0,63 (0,37–1,07)	0,0849
GSTM1/GSTT1 (+/+)		
Низкий	1,00	—
Средний	0,87 (0,62–1,22)	0,4100
Высокий	0,88 (0,65–1,21)	0,4391
GSTM1/GSTT1 (+/–) или GSTM1/GSTT1 (–/+)		
Низкий	1,00	—
Средний	0,82 (0,60–1,12)	0,2214
Высокий	0,80 (0,60–1,08)	0,1498
Нулевой GSTM1/Нулевой GSTT1		
Низкий	1,00	—
Средний	0,26 (0,10–0,63)	0,0032
Высокий	0,28 (0,11–0,67)	0,0045

евой кислоты (фолатов) в рационе питания и повышенным риском образования злокачественных опухолей. Фолаты участвуют в метилировании и синтезе ДНК, что, по-видимому, является причиной того, что их недостаток в организме повышает риск развития рака.

Таблица 3. Риск рака легкого у курящих и никогда не куривших в зависимости от уровня потребления крестоцветных овощей и GST-статуса

Уровень потребления крестоцвет- ных овощей	ОР (95 % ДИ)	<i>p</i>	ОР (95 % ДИ)	<i>p</i>
	Никогда не курившие		Курящие	
GSTM1 (+)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,52 (0,23—1,18)	0,1165	1,01 (0,73—1,40)	0,9403
Высокий	0,36 (0,16—0,79)	0,0107	1,04 (0,77—1,40)	0,8098
Нулевой GSTM1 (—)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,57 (0,23—1042)	0,2258	0,68 (0,48—0,96)	0,0300
Высокий	0,47 (0,19—1,14)	0,0951	0,70 (0,50—0,96)	0,0288
GSTT1 (+)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,56 (0,30—1,05)	0,0687	0,86 (0,66—1,10)	0,2323
Высокий	0,40 (0,22—0,74)	0,0035	0,91 (0,72—1,16)	0,4607
Нулевой GSTT1 (—)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,44 (0,07—2,84)	0,3857	0,71 (0,39—1,29)	0,2639
Высокий	0,22 (0,03—1,56)	0,1303	0,65 (0,37—1,14)	0,1332
M1/T1 (+/+)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,47 (0,20—1,09)	0,0792	0,98 (0,69—1,41)	0,9337
Высокий	0,31 (0,14—0,70)	0,0048	1,07 (0,77—1,50)	0,6806
M1/T1 (+/—) или (—/+)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,84 (0,31—2,25)	0,7307	0,85 (0,61—1,18)	0,3314
Высокий	0,70 (0,27—1,83)	0,4649	0,81 (0,59—1,12)	0,2024
M1/T1 (—/—)				
Низкий	1,00	—	1,00	—
Средний	0,09 (0,01—0,99)	0,0488	0,30 (0,11—0,81)	0,0176
Высокий	0,12 (0,01—1,54)	0,1039	0,31 (0,12—0,82)	0,0176

Метаболизм фолатов зависит от ферментов метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) и тимидилатсинтетазы (*TYMS*), а также от количества солей фолиевой кислоты, поступающей с пищей. В эпидемиологическом исследовании методом случай–контроль, которое включало 2200 больных раком легкого и 811 пациентов с раком ВДПО, изучали роль *MTHFR* в развитии рака легкого и ВДПО с учетом потребления фолатов

Таблица 4. Риск развития рака головы и шеи в зависимости от генотипа *ADH/ALDH* и количества потребления алкоголя

Генотип	ОР (95 % ДИ)		
	В целом	Никогда/малопьющие (≤ 2 раз в нед)	Умеренно/сильно пьющие (≥ 3 раз в нед)
<i>ADH1B R48H</i>			
Arg/Arg (медленный)	1,00	1,00	1,00
Arg/His+His/His (быстрый)	0,47 (0,32–0,70)	0,57 (0,36–0,91)	1,36 (0,17–0,77)
Р тренда	0,0002	0,0186	0,0060
Р интеракции	—	—	0,3342
<i>ALDH2 +82 A>G</i>			
A/A	1,00	1,00	1,00
A/G	1,25 (0,99–1,57)	1,13 (0,86–1,49)	1,57 (1,01–2,43)
G/G	1,63 (0,94–2,82)	1,70 (0,88–3,29)	4,38 (1,32–14,53)
Р тренда	0,0153	0,1144	0,0031
Р интеракции	—	—	0,0890
<i>ALDH2 +348 C>T</i>			
T/T	1,00	1,00	1,00
T/C	1,29 (1,03–1,62)	1,21 (0,92–1,58)	1,76 (1,13–2,75)
C/C	1,63 (0,92–2,89)	1,28 (0,65–2,55)	5,79 (1,49–22,52)
Р тренда	0,0091	0,1501	0,0007
Р интеракции	—	—	0,0328
<i>ALDH2 –261 C>T</i>			
T/T	1,00	1,00	1,00
T/C	1,30 (1,03–1,63)	1,20 (0,92–1,58)	1,76 (1,13–2,74)
C/C	1,66 (0,93–2,95)	1,29 (0,65–2,58)	5,79 (1,49–22,49)
Р тренда	0,0074	0,155	0,0006
Р интеракции	—	—	0,0249

с пищей. Риск развития рака легкого был повышен у гомозиготных носителей C/C вариантов гена *MTHFR* C677T (ОР 1,37; 95 % ДИ 1,10–1,71). После стратификации результатов по потреблению фолатов с пищей выявленный эффект в большей степени проявился у лиц, употребляющих пищу с низким содержанием фолатов. У лиц с T/T-генотипом и низким уровнем потребления фолатов ОР развития рака легкого составило 2,60 (95 % ДИ 1,39–4,88), ОР развития рака ВДПО – 4,14 (95 % ДИ 1,47–11,70). Результаты исследования подтвердили гипотезу о том, что полиморфизм гена *MTHFR* влияет на риск развития рака легкого и ВДПО и зависит от уровня потребления фолатов с пищей, т. е. риск рака легкого и ВДПО определяется взаимодействием генотипа *MTHFR* C677T с фактором окружающей среды [27].

Роль генов, участвующих в метаболизме фолиевой кислоты в этиологии рака почки, изучена в эпидеми-

ологическом исследовании методом случай–контроль [28]. Риск развития рака почки повышен у индивидов с C/T- (ОР 1,45; 95 % ДИ 1,17–1,79) и T/T-вариантами (ОР 1,40; 95 % ДИ 0,99–1,98) (Р тренда 0,001) A222V гена *MTHFR* по сравнению с носителями часто встречающегося гомозиготного C/C-варианта. В контрольной группе гомозиготный T/T-вариант встречается в 10 % случаев, а гетерозиготный C/T – в 30 %. После стратификации по уровню потребления овощей повышенный риск развития рака почки среди носителей C/T- и T/T-вариантов отмечали только у лиц с низким потреблением овощей (ОР 1,50; 95 % ДИ 1,04–2,17 и ОР 1,95; 95 % ДИ 1,06–3,61 соответственно) (табл. 5).

Носительство редких вариантов генов *TYMS* (IVS2–405T>C, 3' UTR (Ex8+157) C>T, 3' UTR A>G) было связано со сниженным риском развития рака почки по сравнению с часто встречающимися генотипами: *TYMS* (IVS2–405) – CT/TT и CC/TT (ОР 0,73

Таблица 5. Риск развития рака почки в зависимости от полиморфизма *TYMS*, *MTHFR* и частоты потребления овощей

Вариант генотипа	ОР (95 % ДИ)				Р тренда	Р интеракции
	В целом	Частота потребления овощей				
		редкое	среднее	частое		
MTHFR A222V (Ex5+79 C >T)						
CC	1,00	1,00	1,16 (0,83–1,62)	0,86 (0,59–1,26)	0,55	
CT	1,45 (1,17–1,79)	1,50 (1,04–2,17)	1,64 (1,16–2,34)	1,12 (0,81–1,75)	0,31	
TT	1,40 (0,99–1,98)	1,95 (1,06–3,61)	1,43 (0,85–2,43)	0,93 (0,49–1,75)	0,05	
Р тренда	0,001	0,007	0,05	0,59		0,22
TYMS (IVS2–405 T>C)						
TT	1,00	1,00	0,84 (0,57–1,25)	0,42 (0,27–0,67)	<0,0	
CT	0,73 (0,57–0,93)	0,47 (0,32–0,70)	0,66 (0,45–0,95)	0,54 (0,36–0,80)	0,28	
CC	0,72 (0,50–1,04)	0,67 (0,40–1,12)	0,60 (0,37–0,91)	0,49 (0,30–0,82)	0,35	
Р тренда	0,05	0,02	0,06	0,38		0,04
TYMS 3'UTR (Ex8+157 C>T)						
CC	1,00	1,00	0,89 (0,65–1,23)	0,47 (0,33–0,67)	0,00	
CT	1,05 (0,78–1,41)	0,73 (0,48–0,93)	0,73 (0,53–1,01)	0,76 (0,53–1,08)	0,50	
TT	1,10 (0,63–1,92)	0,42 (0,21–0,85)	1,08 (0,63–1,85)	0,56 (0,30–1,04)	0,90	
Р тренда	0,71	0,01	0,73	0,06		0,001
TYMS 3'UTR (Ex8+227 A>G)						
AA	1,00	1,00	1,00 (0,76–1,32)	0,59 (0,43–0,80)	0,00	
AG	1,09 (0,82–1,44)	0,75 (0,52–1,08)	0,82 (0,60–1,13)	0,92 (0,59–1,21)	0,28	
GG	1,06 (0,55–2,04)	0,43 (0,18–1,03)	1,91 (0,84–4,37)	0,23 (0,06–0,81)	0,35	
Р тренда	0,63	0,04	0,81	0,13		0,03

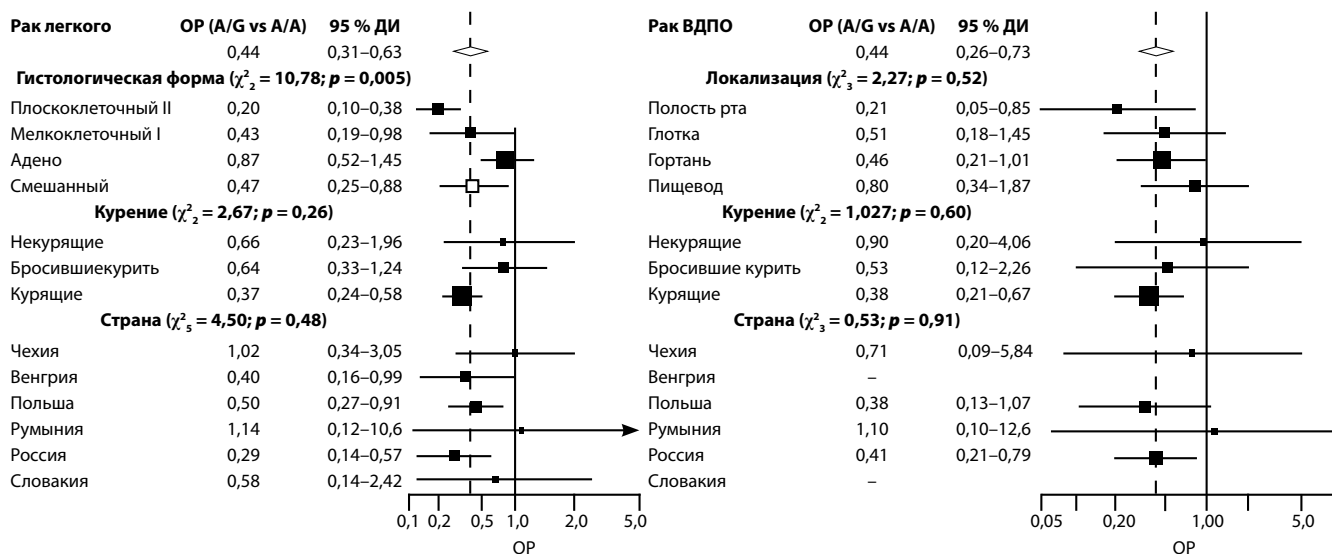
и 0,72 соответственно, Р тренда 0,05), *TYMS* 3'UTR (Ex8+157) – С/Т и Т/Т (ОР 73,0 и 0,42 соответственно, Р тренда 0,01), *TYMS* 3'UTR (Ex8+227) – АГ/АА и ГГ/АА (ОР 0,75 и 0,43 соответственно, Р тренда 0,04). После стратификации по уровню потребления овощей наиболее высокий риск наблюдали у носителей распространенных вариантов, которые ели мало овощей. Риск достоверно снижался с ростом потребления овощей ($p < 0,00001$). Имела место статистически достоверная мультипликативная интеракция между всеми вариантами всех 3 генов *TYMS* и уровнем потребления овощей (Р интеракции: 0,04; 0,001; 0,03 соответственно) (см. табл. 5) [28].

Представленные результаты указывают на то, что полиморфизм генов *MTHFR* и *TYMS* влияет на риск развития рака легкого, ВДПО и почки. Однако это влияние взаимосвязано с уровнем потребления овощей. Это подтверждает, что риск развития спонтанных опухолей зависит от интеракции между генетическим полиморфизмом, т. е. генотипом и образом жизни.

Гены, контролирующие клеточный цикл

Ключевой ген проводящей системы сигналов от поврежденной ДНК к различным эффекторам – *CHEK2*. Продукт этого гена может связываться и активировать белок p53, а также другие белки. При врожденных мутациях *CHEK2* наблюдается увеличение риска развития новообразований. Герминальные мутации гена *CHEK2* были выявлены у части пациентов с синдромом Ли–Фраумени, не имеющих мутаций в *p53*, что позволило предположить, что именно эти мутации могут быть причиной синдрома и являться достаточным условием для развития первично-множественных опухолей [29]. Однако влияние врожденных мутаций *CHEK2* на канцерогенез, связанный с курением, оказался противоположным.

Исследование методом случай–контроль, проведенное в Польше, показало, что у индивидов с редким гетерозиготным вариантом Т/С гена *CHEK2* риск развития рака легкого снижен по сравнению с носителями распространенного варианта Т/Т. Однако носи-



Относительный риск рака легкого и рака верхних дыхательных и пищеварительных органов в зависимости от генотипа *CHEK2*. Гетерозиготный (A/G) генотип; распространенный (A/A) генотип. ОР — относительный риск; ДИ — доверительный интервал; ВДПО — верхние дыхательные и пищеварительные органы. ОР стандартизован по возрасту, полу и курению

тельство редкого варианта повышало риск развития рака почки [30].

Влияние полиморфизма гена *CHEK2* на риск развития рака легкого, почки и ВДПО, а именно эффект носительства редкого гетерозиготного варианта (Т/С), был изучен методом случай–контроль в странах Центральной и Восточной Европы [31]. Генотип Т/С был выявлен у 5 % лиц контрольной группы ($n = 2934$). Однако частота встречаемости этого генотипа значительно варьировала: была наиболее высокой в российской контрольной группе (7,6 %) и низкой в румынской (1,0 %) (тест на гетерогенность $P = 0,0000001$). У обладателей гетерозиготного генотипа Т/С отмечали выраженное и статистически достоверное снижение риска развития рака легкого (ОР 0,44; 95 % ДИ 0,31–0,63; $P < 0,00001$) и ВДПО (ОР 0,44; 95 % ДИ 0,26–0,73; $P = 0,001$) по сравнению с носителями распространенного генотипа Т/Т. Значительное и статистически достоверное снижение риска развития рака легкого и ВДПО было обнаружено в российской (ОР 0,3; 95 % ДИ 0,1–0,6), венгерской (ОР 0,4; 95 % ДИ 0,1–1,0) и польской (ОР 0,5; 95 % ДИ 0,3–0,9) популяциях, где частота гетерозиготного генотипа Т/С достаточно высока (3,1–7,6 %), но не в чешской и румынской популяциях, в которых этот генотип встречается редко (1,0–2,5 %) (см. рисунок).

Влияние генотипа *CHEK2* было неодинаково для разных гистологических форм рака (P на гетерогенность 0,001). Носительство генотипа Т/С было связано со значительным снижением риска развития плоскоклеточного рака (ОР 0,20; 95 % ДИ 0,10–0,38; $P = 0,00001$). Снижение риска было менее выраженным для мелкоклеточного рака (ОР 0,43; 95 % ДИ 0,19–0,98) и отсутствовало для аденокарциномы (ОР 0,87; 95 % ДИ 0,52–1,45).

Кроме того, риск развития рака легкого (ОР 0,37; 95 % ДИ 0,24–0,58; $P = 0,00001$) и ВДПО (ОР 0,38; 95 % ДИ 0,21–0,67; $P = 0,001$) был снижен только среди курящих лиц, но не среди бросивших курить и никогда не куривших. Среди некурящих носителей варианта С/Т риск развития рака легкого составлял 0,66 (95 % ДИ 0,23–1,96), а рака ВДПО — 0,90 (95 % ДИ 0,20–4,06) (см. рисунок).

Выявленный протективный эффект варианта Т/С гена *CHEK2*, значительно более выраженный среди курящих по сравнению с никогда не курившими и бросившими курить, свидетельствует о интеракции между наследственностью и влиянием внешних факторов в этиологии злокачественных опухолей.

Таким образом, большинство спонтанных опухолей человека развиваются в результате комбинированного эффекта генетического полиморфизма и внешних факторов, взаимодействия эндогенных и экзогенных факторов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Заридзе Д.Г. Профилактика рака. М.: ИМА-Пресс, 2009. [Zaridze D.G. Cancer prophylactics. Moscow: IMA-Press, 2009. (In Russ.)].
2. Lindor N.M., Lindor C.G., Green M.H. Hereditary neoplastic syndrome. In: Cancer Epidemiology and Prevention. Eds. by: D. Schottenfeld, J. Fraumeni. Oxford University Press, 2006. Pp. 562–76.
3. Caporaso N.E. Genetic modifiers of cancer risk. In: Cancer Epidemiology and Prevention. Eds. by: D. Schottenfeld, J. Fraumeni. Oxford University Press, 2006. Pp. 577–602.
4. Заридзе Д.Г. Молекулярная эпидемиология рака. Биохимия 2009;73(5):663–76. [Zaridze D.G. Molecular epidemiology of cancer. Biokhimiya = Biochemistry 2009;73(5):663–76. (In Russ.)].
5. Taioli E. Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. Carcinogenesis 2008;29(8):1467–74.
6. Schwartz A.G., Prysak G.M., Bock C.H., Cote M.L. The molecular epidemiology of lung cancer. Carcinogenesis 2007;28(3):507–18.
7. García-Closas M., Malats N., Silverman D. et al. *NAT2* slow acetylation, *GSTM1* null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. Lancet 2005;366(9486):649–59.
8. Wikman H., Thiel S., Jager B. et al. Relevance of N-acetyltransferase 1 and 2 (*NAT1*, *NAT2*) genetic polymorphisms in non-small cell lung cancer susceptibility. Pharmacogenetics 2001;11:157–68.
9. McKay J. D., Hashibe M., Hung R.J. et al. Sequence variants of *NAT1* and *NAT2* and other xenometabolic genes and risk of lung and aerodigestive tract cancers in Central Europe. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17(1):141–7.
10. Brennan P., Hsu C.C., Moullan N. et al. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. Lancet 2005;366(9496):1558–60.
11. Raimondi S., Paracchini V., Autrup H. et al. Meta- and pooled analysis of *GSTT1* and lung cancer: a HuGE-GSEC review. Am J Epidemiol 2006;164(11):1027–42.
12. Buzio L., Tondel M., de Palma G. et al. Occupational risk factors for renal cell cancer. An Italian case-control study. Med Lav 2002;93(4):303–9.
13. Harth V., Brüning T., Bolt H.M. Renal carcinogenicity of trichloroethylene: update, mode of action, and fundamentals for occupational standard setting. Rev Environ Health 2005;20(2):103–18.
14. Karami S., Boffetta P., Rothman N. et al. Renal cell carcinoma, occupational pesticide exposure and modification by glutathione S-transferase polymorphisms. Carcinogenesis 2008;29(8):1567–71.
15. Moore L.E., Boffetta P., Karami S. et al. Occupational trichloroethylene exposure and renal carcinoma risk: evidence of genetic susceptibility by reductive metabolism gene variants. Cancer Res 2010;70(16):6527–36.
16. World Cancer Research Fund/American Institute Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity and Prevention of Cancer: Global Perspective. Washington, DC: AICR, 2007.
17. Hecht S.S., Trushin N., Rigotty J. et al. Inhibitory effects of 6-phenylhexyl isothiocyanate on 4-(methylnitrosamino) – 1-(3-pyridyl) – 1-butanone metabolic activation and lung tumorigenesis in rats. Carcinogenesis 1996;17(9):2061–7.
18. London S.J., Yuan J.M., Chung F.L. et al. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. Lancet 2000;356(9231):724–9.
19. Fowke J.H., Shu X.O., Dai Q. et al. Urinary isothiocyanate excretion, brassica consumption, and gene polymorphisms among women living in Shanghai, China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003;12(12):1536–9.
20. Brennan P., Hsu C.C., Moullan N. et al. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. Lancet 2005;4:366(9496):1558–60.
21. Moore L.E., Brennan P., Karami S. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms, cruciferous vegetable intake and cancer risk in the Central and Eastern European Kidney Cancer Study. Carcinogenesis 2007;28(9):1960–4.
22. Zaridze D., Brennan P., Borenham J. et al. Alcohol and cause-specific mortality in Russia: a retrospective case-control study of 48,557 adults. Lancet 2009;373(9682):2201–14.
23. Zaridze D., Lewington S., Boroda A. et al. Alcohol mortality in Russia: a prospective observational study of 151 000 adults. Lancet 2014;383(9927):1465–73.
24. Personal habits and indoor combustions. A review of human carcinogens. In: IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 100E. Lyon: IARC, 2012.
25. Hashibe M., Boffetta P., Zaridze D. et al. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(4):696–703.
26. Hashibe M., McKay J. D., Curado M.P. et al. Multiple ADH genes are associated with upper aerodigestive cancers. Nat Genet 2008;40(6):707–9.
27. Hung R.J., Hashibe M., McKay J. et al. Folate-related genes and the risk of tobacco-related cancers in Central Europe. Carcinogenesis 2007;28(6):1334–40.
28. Moore L.E., Hung R., Karami S. et al. Folate metabolism genes, vegetable intake and renal cancer risk in central Europe. Int J Cancer 2008;122(8):1710–5.
29. Varley J. TP53, CHEK2, and the Li–Fraumeni syndrome. Methods Mol Biol 2003;222:117–29.
30. Cybulski C., Masojc B., Oszutowska D. et al. Constitutional CHEK2 mutations are associated with a decreased risk of lung and laryngeal cancers. Carcinogenesis 2008;29(4):762–5.
31. Brennan P., McKay J., Moore L. et al. Uncommon CHEK2 mis-sense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: case control study. Hum Mol Genet 2007;16(15):1794–801.

Генетические и эпигенетические механизмы регуляции вирусов папиллом человека

С.В. Винокурова

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Светлана Владимировна Винокурова vinokourova@mail.ru

Инфекция вирусом папиллом человека (*human papillomavirus, HPV*) высокого канцерогенного риска является этиологическим фактором некоторых видов опухолей аногенитальной области и опухолей головы и шеи. Многочисленные эпидемиологические исследования показали связь длительно персистирующей инфекции *HPV* высокого канцерогенного риска с последующим развитием рака шейки матки и опухолей других локализаций. Экспериментальные данные с использованием цервикальных клеточных моделей и клинических образцов опухолей шейки матки продемонстрировали, что более чем в 99 % клинических образцов рака шейки матки вирусные онкогены *E6* и *E7* сохраняются и экспрессируются. Вирусные онкогены могут трансформировать кератиноциты в экспериментах *in vitro*; их ингибирование приводит к подавлению неопластического роста клеток. Молекулярные механизмы иммортализации и трансформации вирусными онкогенами *E6* и *E7* достаточно хорошо исследованы. Однако остаются неясными механизмы дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов, приводящие к переходу от продуктивного вирусного цикла к трансформации плоскоклеточного эпителия. В настоящем обзоре описано современное представление о продуктивном вирусном цикле и обсуждаются потенциальные молекулярные механизмы, вызывающие инициацию процесса трансформации нормального эпителия в неопластические предраковые поражения. Выяснение молекулярных механизмов, необходимых для неопластической трансформации *HPV*-инфицированных нормальных клеток в опухолевые, может предоставить основу для концептуально новых терапевтических подходов лечения *HPV*-ассоциированных опухолей.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, вирус папилломы высокого канцерогенного риска, *HPV*-ассоциированная опухоль, рак шейки матки, интеграция вирусного генома, метилирование вирусного генома

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-18–25

Genetic and epigenetic mechanisms of regulation of human papillomavirus

S. V. Vinokurova

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Infections with high-risk human papillomaviruses (*HPV*) are the etiological factor of certain types of human cancers in anogenital tract and head and neck cancers. Extensive epidemiological studies demonstrated the association of persistent high-risk *HPV* infection and the later development of cervical and other cancers. Experimental data using cell lines models and cervical cancers demonstrate that in more than 99 % of clinical samples the viral *E6* and *E7* genes are retained and expressed. These genes can transform human cells and inhibition of their expression in cancer cells results in loss of neoplastic growth properties. Molecular mechanisms of immortalization and transformation by *E6* and *E7* have extensively been investigated. However, the mechanism of *E6* and *E7* deregulation that triggers the shift from permissive infection to neoplastic transforming infection is still unclear. This review describes the current knowledge about the viral life cycle and discusses the molecular mechanisms that potentially allow the virus to escape its normal control and may trigger neoplastic progression. The molecular clarification of these events required for transformation of *HPV*-infected cells into cancer will provide a basis for conceptually novel diagnostic and therapeutic strategies and approaches.

Key words: human papillomavirus, high-risk papillomavirus, *HPV*-associated cancer, cervical cancer, viral genome integration, viral genome methylation

Вирусы папиллом и их ассоциация с болезнями человека

Вирусы папиллом относятся к семейству *Papillomaviridae*, являются эпителиотропными вирусами и представляют собой одну из наиболее гетерогенных групп вирусов, которые инфицируют как человека, так и животных. В настоящее время известно более 189 типов вирусов папиллом, из них 120 относятся к вирусам папиллом человека (*human papillomaviruses, HPV*) [1].

HPV инфицируют базальные клетки плоскоклеточного эпителия кожных или слизистых покровов ротовой и генитальной областей. В связи с этим их подразделяют на кожные и мукозальные. Из 189 типов *HPV* около 40 инфицируют слизистый эпителий генитального тракта [1]. По степени риска развития онкологических заболеваний их подразделяют на 2 основные группы: высокого (*high-risk human papillomaviruses*,

HR-HPV) и низкого (low-risk human papillomaviruses, LR-HPV) канцерогенного риска. К HR-HPV относят HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 70-го типов, к LR-HPV – 6, 11, 42, 43 и 44-го типов [2].

Наиболее частые проявления инфекции, вызванные HPV, поражающими кожный эпителий, – бородавки и папилломы [3]. К доброкачественным поражениям слизистого эпителия генитальной области относятся остроконечные кондиломы, которые вызываются LR-HPV, такими как HPV 6-го и 11-го типов. Однако и другие типы HPV, включая HPV 2, 16 и 18-го типов, могут вызывать образование генитальных кондилом.

Пристальное внимание исследователей к HPV связано с HPV-ассоциированными опухолями, наиболее значимыми из которых являются рак шейки матки, опухоли аногенитальной области и ротоглотки [4–6]. Ассоциация HPV с опухолевыми заболеваниями человека наиболее хорошо изучена для рака шейки матки. Частота обнаружения HR-HPV в инвазивных опухолях шейки матки составляет около 99 %, в опухолях ануса – 96 %, вульвы – 90 %, влагалища – 85 %.

Только 50 % опухолей ротоглотки ассоциированы с HR-HPV, преимущественно с HPV 16-го типа. HPV-ассоциированные карциномы ротоглотки представляют собой отдельную группу опухолей, отличающуюся по молекулярно-биологическим и клиническим характеристикам от HPV-негативных опухолей [3]. В настоящее время также активно обсуждается роль HPV в инициации некоторых видов рака кожи человека [7].

Структура генома вируса папилломы человека

Вirusные частицы имеют у всех HPV сходную безоболочечную икосаэдрическую структуру диаметром 50–60 нм. Геном HPV представляет собой двуцепочечную кольцевую молекулу ДНК (эписому) размером около 8000 пар оснований, которая содержит 8–10 рамок считывания (рис. 1). В геноме HPV выделяют несколько основных районов: некодирующий регуляторный участок (upstream regulatory region, URR), участок, кодирующий ранние гены *E1–E5* (*E* – early genes), и участок, кодирующий поздние гены *L1* и *L2* (*L* – late genes) [8, 9]. Рамки считывания в вирусном геноме разделяют на ранние и поздние в зависимости от времени начала экспрессии в период нормального вирусного цикла.

Ранние гены *E1* и *E2* вовлечены в контроль вирусной репликации. *E1* кодирует вирусоспецифическую ДНК-хелиразу, необходимую для вирусной репликации. *E2*, который может связываться как с вирусной, так и с клеточной ДНК, является ключевым регулятором вирусной транскрипции и репликации, а также гарантирует правильное распределение вирусных геномов в каждую из дочерних клеток во время деления. Продукт гена *E5* обеспечивает механизмы иммунной эвазии и оптимизации эффективности амплификации генома. Белок *E4* играет важную роль в созревании

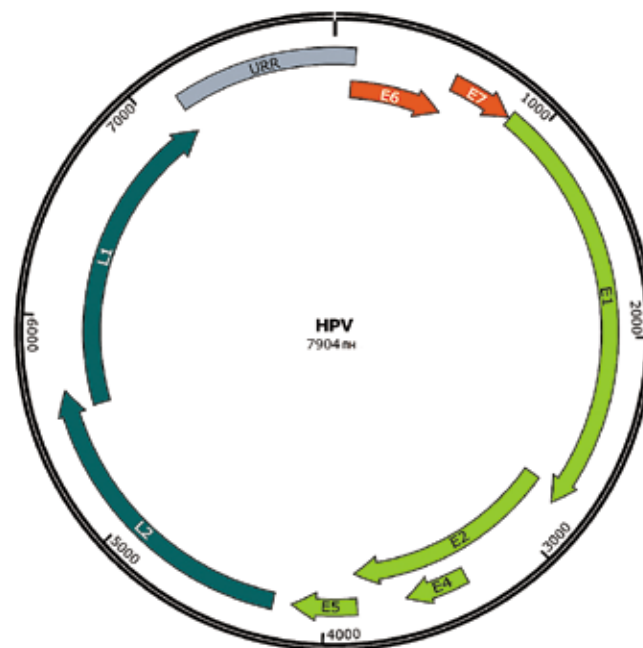


Рис. 1. Структура генома вируса папилломы. Гены обозначены стрелками, указывающими направление считывания. *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* и *E7* – ранние гены, *L1* и *L2* – поздние гены. URR – регуляторная последовательность вирусного генома

вирусных частиц и высвобождении вируса с поверхности эпителия. *E6* и *E7* являются вирусными онкобелками и играют ключевую роль в период нормального продуктивного вирусного цикла, взаимодействуя с белками-супрессорами клеточного цикла p53 и pRB в инфицированном эпителии [4, 10].

Поздние гены *L1* и *L2* кодируют малый и главный капсидные белки.

URR располагается между *L1* и началом ранней области, содержит промоторные элементы, сайты связывания факторов транскрипции (включая палиндромные последовательности, распознаваемые вирусным белком *E2*) и вирусную точку начала репликации, с которой связывается *E1* [3].

Различные виды вирусной инфекции: латентная, продуктивная и трансформирующая

Способность различных типов HPV осуществлять продуктивный вирусный цикл зависит от процесса дифференцировки плоскоклеточного эпителия. Общие принципы организации вирусного цикла сходны для всех HPV. Для инфицирования HPV необходимы микротравмы и повреждения эпителия, приводящие к инфицированию базальных и парабазальных митотически активных клеток эпителия, способных поддерживать персистенцию вируса [11]. Далее наступает фаза первоначальной амплификации вирусного генома для поддержания небольшого (50–100) количества копий вирусной эписомы в клетках. На этой стадии, называемой латентной инфекцией, вирус не вызывает цитопатологических эффектов в инфицированном эпителии и клинически не проявляется, экспрессия ви-

русских генов отсутствует или находится на очень низком уровне (рис. 2) [12].

Однако в некоторых инфицированных клетках происходит активация экспрессии вирусных генов и запуск механизмов вирусной репликации и инициации продуктивной вирусной инфекции. Клиническое проявление продуктивной инфекции — возникновение межэпителиальных неоплазий I степени (для шейки матки — цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки I степени (cervical intraepithelial neoplasia, CIN1)). Молекулярные механизмы, контролирующие латентную и продуктивную инфекции, в настоящее время недостаточно изучены [13]. С началом вирусной экспрессии ранний промотор (p97 для HPV 16 и 31-го типов, p107 для HPV 18-го типа) регулирует экспрессию вирусных онкобелков, а также белков, вовлеченных в репликацию *E1* и *E2*, поддерживая их низкий и сбалансированный уровень [14]. Сбалансированная экспрессия ранних генов (*E1*, *E2*, *E6*, *E7*) позволяет поддерживать низкий, но четко контролируемый уровень вирусной репликации, которая на этом этапе синхронизирована с делением клеток эпителия хозяина [10].

В этой связи вирусный белок E2 работает как мультифункциональный полипептид, играющий критическую роль в вирусной репликации и регуляции транскрипции с раннего промотора [15]. E2 имеет 4 консервативных сайта связывания (E2 binding sites, E2BS) в URR с различной аффинностью. При низких концентрациях E2, связываясь с высокоаффинным сайтом E2BS-1, активирует транскрипцию с раннего промотора, приводящую к увеличению экспрессии ранних

генов *E6* и *E7*, и самого E2. При высоких концентрациях E2 связывается с низкоаффинными проксимальными сайтами E2BS-2, -3 и подавляет активность раннего промотора за счет вытеснения клеточных Sp1- и TBP-активирующих транскрипционных факторов с их сайтов связывания [16, 17].

Таким образом, при нормальном вирусном цикле осуществляется тонкая регуляция активности раннего промотора и поддерживается равновесие в экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* [18–20].

Вирусные онкобелки E6 и E7 при нормальном вирусном цикле вовлечены в поддержание репликации эписомального вирусного генома за счет взаимодействия с регуляторами клеточного цикла, такими как p53-, pRB- и PDZ-доменсодержащими белками и многими другими клеточными факторами [21].

Механизм репликации находится в активном состоянии в пролиферирующих базальных клетках эпителия, тогда как в постмитотических дифференцирующихся клетках промежуточного поверхностного слоя эпителия «репликативная машина» клетки не работает [22]. HPV обладают способностью преодолевать блокировку синтеза ДНК, происходящую во время дифференцировки плоскоклеточного эпителия [23]. Для завершения вирусного цикла HPV должны воспроизвести свой геном и упаковать его в вирусные частицы. Для этого необходимы активация как раннего, так и позднего промоторов, и повышение экспрессии вирусных белков (*E1*, *E2*, *E4* и *E5*), вовлеченных в репликацию и созревание вирусного капсида [24]. Это происходит в промежуточных и верхних слоях эпителия, где про-

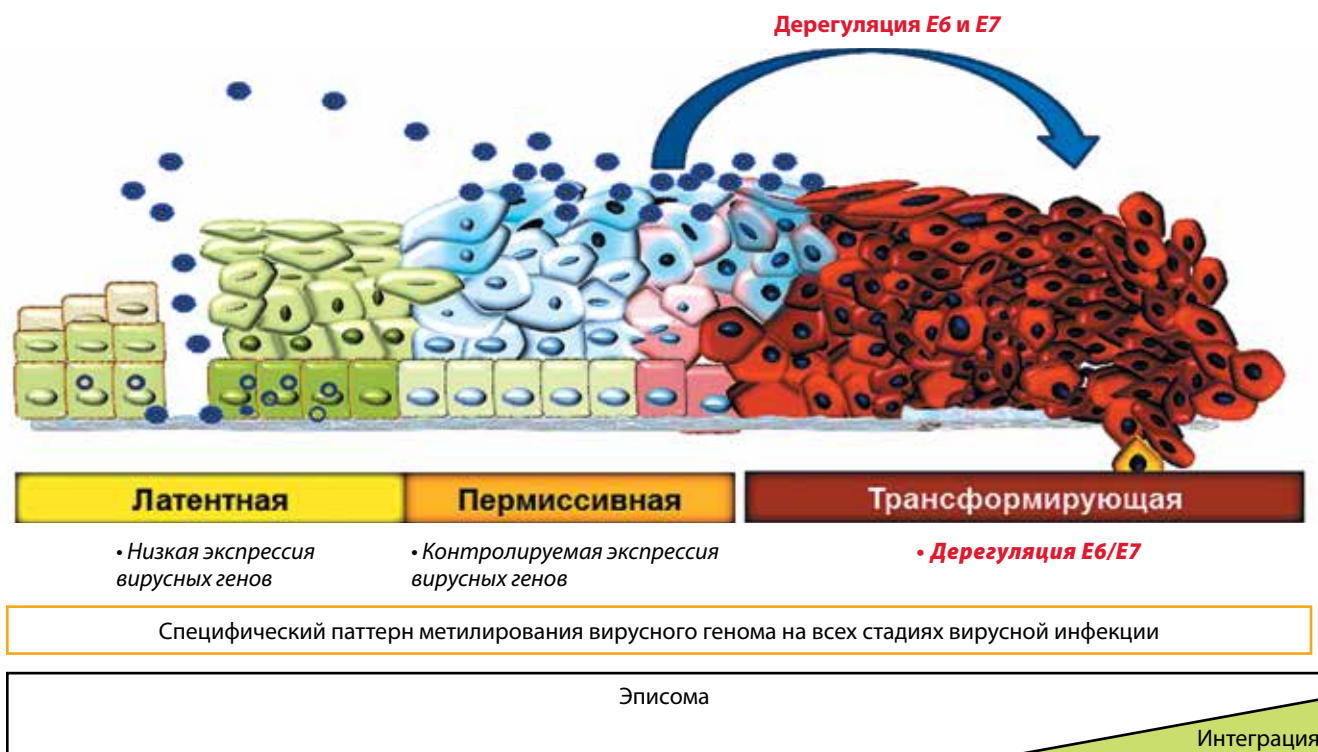


Рис. 2. Схематическое представление различных типов вирусной инфекции [13]

цесс дифференцировки уже начался. Как только инфицированные клетки достигают стадии терминальной дифференцировки, в поверхностных слоях эпителия вирусные капсидные белки L1 и L2 обеспечивают сборку вирусных частиц [25, 26]. HPV не являются литическими вирусами, и высвобождение новообразованных вирусных частиц происходит вместе с физиологическим слущиванием верхних слоев плоскоклеточного эпителия.

HPV-инфекция может прогрессировать в определенных клетках в трансформирующую инфекцию и, в конечном счете, в инвазивные опухоли (см. рис. 2). Процесс трансформации происходит преимущественно в специфической зоне перехода плоскоклеточного и цилиндрического эпителия (зона трансформации шейки матки). Особая предрасположенность зоны трансформации шейки матки к развитию опухолей, возможно, связана с тем, что в этой зоне находятся кубические стволовые клетки, которые, как полагают, могут быть наиболее чувствительны к трансформации после инфекции HR-HPV [27].

Ключевой механизм перехода продуктивной инфекции HR-HPV в трансформирующую — повышение экспрессии вирусных трансформирующих белков E6 и E7 в базальных и парабазальных клетках плоскоклеточного эпителия. Высокий уровень онкобелков HR-HPV E6 и E7 в клетках нарушает антипролиферативный клеточный механизм и индуцирует хромосомную нестабильность [28, 29], что является ключевым событием, запускающим каскад канцерогенной прогрессии [9].

Молекулярные механизмы, приводящие к неконтролируемой экспрессии вирусных генов, в настоящее время недостаточно ясны. Существует несколько различных концепций, объясняющих нарушение регуляции экспрессии вирусных генов.

Генетическая регуляция

Наиболее распространенная до недавнего времени концепция предполагает, что интеграция генома HPV и разрыв рамки считывания *E2* приводят к нарушению регуляторной функции *E2* [30, 31]. Поскольку высокий уровень *E2* ингибирует транскрипционную активность URR HPV, интеграция вирусного генома приводит к нарушению негативного контроля и повышенной экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* на ранней стадии вирусной трансформации [15]. Однако эта концепция противоречит недавним исследованиям, показавшим, что даже злокачественные инвазивные HPV-ассоциированные опухоли содержат вирусный геном в эписомальной, а не интегрированной форме [32–34] и экспрессируют полноразмерный белок *E2* [35]. Более того, интеграция вирусного генома является поздним событием в прогрессии пренеопластических интраэпителиальных поражений в инвазивные опухоли [32, 33].

Если интеграция вирусного генома — инициирующее событие в дерегуляции экспрессии генов *E6* и *E7*,

то интеграция HPV должна существенно предшествовать переходу из пермиссивной в трансформирующую инфекцию. Трансформирующая инфекция возникает на ранних этапах развития предопухолевых состояний, таких как CIN1. Это подтверждается иммуногистохимическими исследованиями с использованием p16^{INK4a}, суррогатного маркера трансформирующей инфекции HR-HPV [36, 37]. p16^{INK4a}-положительные клетки появляются уже в CIN1 как субклоны в пермиссивных реплицирующих HPV-поражениях [36, 38]. Эти клетки представляют собой ранние стадии HPV-индуцированной трансформации, которые, разрастаясь, дают начало прогрессирующим поражениям II и III степеней (CIN2 и CIN3) и, в конечном счете инвазивным опухолям. Идентификация p16^{INK4a}-положительных клонов значительно раньше интеграции вирусного генома доказывает, что последняя является не причиной, а следствием дерегуляции вирусных онкогенов и связанной с этим процессом трансформации. Таким образом, возможно, какие-то альтернативные механизмы принимают участие в нарушении контролируемой экспрессии вирусных онкогенов и инициируют процесс перехода из пермиссивной инфекции HPV в трансформирующую. На основании последних данных можно предположить, что эпигенетические модификации вирусного генома, например ДНК-метилирование, могут участвовать в механизме регуляции вирусного генома.

Эпигенетические механизмы регуляции

ДНК-метилирование — важный эпигенетический механизм регуляции транскрипционной активности генома. Метилирование цитозина в положении 5' в составе CpG-динуклеотидов является одной из наиболее распространенных модификаций ДНК, около 70 % динуклеотидов в геноме человека метилированы [39]. CpG-динуклеотиды недостаточно представлены в геноме, за исключением коротких последовательностей ДНК, известных как CpG-островки. CpG-островки — GC-богатые последовательности (> 50 % CpG) ДНК длиной от 200 до нескольких тысяч пар нуклеотидов, часто ассоциированные с промоторами и первыми экзонами клеточных генов. В отличие от основной части ДНК CpG-сайты в островках преимущественно неметилированы [40]. Функциональные исследования демонстрируют, что гиперметилирование CpG-островков в составе промоторов генов связано с транскрипционной репрессией гена [41–43].

Контроль экспрессии генов за счет эпигенетических модификаций различных ДНК-последовательностей является фундаментальным процессом, который влияет на эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку и старение и другие ключевые биологические процессы [44]. Кроме того, изменения и нарушения эпигенетических регуляторных механизмов, особенно метилирования ДНК, играют существенную

роль в возникновении и прогрессировании опухолей [45, 46].

За последние годы расширилось понимание роли межгенного метилирования (intragenic methylation, IGM) ДНК и метилирования кодирующих участков гена («тела гена») в регуляции и эффективности транскрипции. Показано, что метилирование кодирующих участков гена положительно коррелирует с уровнем экспрессии [47]. Предполагается, что IGM может подавлять инициацию транскрипции с альтернативных сайтов [48], модифицировать эффективность транскрипции с помощью РНК-полимеразы II и транскрипционных комплексов [49], изменять положение нуклеосом [50] и влиять на сплайсинг [51–53]. Таким образом, метилирование отдельных участков генома может приводить как к супрессии, так и к активации генов в зависимости от локализации метилирования ДНК. В целом геном опухолевых клеток имеет тенденцию к гипометилированию наряду с гиперметилированием промоторов генов и специфических IGM-сайтов [54, 55].

Метилирование генома вируса папилломы

Многочисленные исследования позволяют предположить, что метилирование ДНК — один из важнейших регуляторных механизмов экспрессии генов HPV на различных стадиях вирусной инфекции: нормального вирусного цикла и вирусной трансформации.

Потенциальные мишени для ДНК-метилирования — CpG-динуклеотиды — недостаточно представлены в геноме вируса папилломы, что является эволюционным механизмом, выработанным вирусами для противодействия клеточному защитному механизму метилирования чужеродного генетического материала [56, 57]. Однако анализ распределения CpG-динуклеотидов и CpG-островков среди 92 различных типов HPV указывает на специфическую локализацию CpG в различных участках вирусного генома, таких как ранние и поздние гены, и на существующие различия между мукозальными и кожными HPVs и HR-HPV и LR-HPV [57]. Эти данные показывают возможные различия в чувствительности к метилированию различных типов HPV, отличающихся тропизмом и канцерогенным риском. Более того, детальное исследование сайтов связывания вирусного белка E2 среди 73 типов HPV демонстрирует существование очевидного давления эволюционного отбора, способствующего сохранению CpG-динуклеотидов в сайтах связывания E2 для всех типов HPV, что указывает на функциональную значимость метилирования этих сайтов для нормального вирусного цикла [58].

Первое доказательство того, что метилирование ДНК — важный регуляторный механизм, модулирующий HPV-экспрессию, было получено в экспериментах *in vitro*, демонстрирующих, что транскрипционная активность HPV 18-го типа URR подавляется метили-

рованием [59]. Позже было показано, что способность белка E2 связываться с консенсусным сайтом *in vitro* блокируется метилированием CpG-динуклеотидов [60]. Эти данные позволяют предположить, что метилирование препятствует регуляторной функции E2 за счет блокирования связывания с E2BS и изменяет транскрипцию ранних генов, включая вирусные онкогены E6 и E7 [61, 62].

Многочисленные исследования продемонстрировали увеличение метилирования специфических CpG в процессе прогрессии CIN [62–66]. Гиперметилирование определенных CpG-сайтов в последовательностях L1, L2 и E2/E4 HPV 16-го типа предлагают использовать как диагностический, так и прогностический маркеры прогрессии предраковых цервикальных поражений [67, 68]. Сходные результаты, полученные для других типов HPV (18, 31 и 45-го типов), указывают на то, что метилирование последовательностей L1 и L2 канцерогенных типов HPV является общим свойством, которое потенциально может быть использовано как диагностический маркер для детекции предраковых цервикальных поражений [67].

Эти данные позволяют предположить, что метилирование генома HPV может играть существенную роль в контроле вирусной транскрипции и репликации во время продуктивного вирусного цикла и неопластической трансформации.

В процессе поиска эпигенетических механизмов регуляции экспрессии и репликации эписомальной формы генома HPV было установлено, что паттерн метилирования HPV 16-го типа специфически меняется в жизненном цикле вируса в процессе дифференцировки плоскоклеточного эпителия, а также при трансформирующей инфекции (рис. 3) [69]. При трансформации эпителия было обнаружено существенное увеличение метилирования дистального (E2BS-1) и проксимальных (E2BS-3 и -4) сайтов связывания вирусного белка E2. В культуре клеток было подтверждено, что метилирование дистального сайта связывания E2 (E2BS-1) приводит к существенной активации раннего промотора и увеличению экспрессии вирусных онкогенов. При трансформирующей инфекции метилирование HPV 16-го типа URR (особенно метилирование E2BS-1, -3 и -4) зависит от статуса HPV [70].

Кроме того, на модели HPV 31-го типа было показано, что активация раннего и позднего промоторов зависит от изменения модификаций гистонов во время дифференцировки кератиноцитов [71].

Таким образом, участие не только генетических (мутационных), но и эпигенетических событий в нарушении экспрессии вирусных генов в канцерогенезе не вызывает сомнений.

Выявление механизмов дерегуляции вирусных онкогенов имеет значение не только для понимания механизмов канцерогенеза, но и для разработки диагностических и медикаментозных подходов в лечении

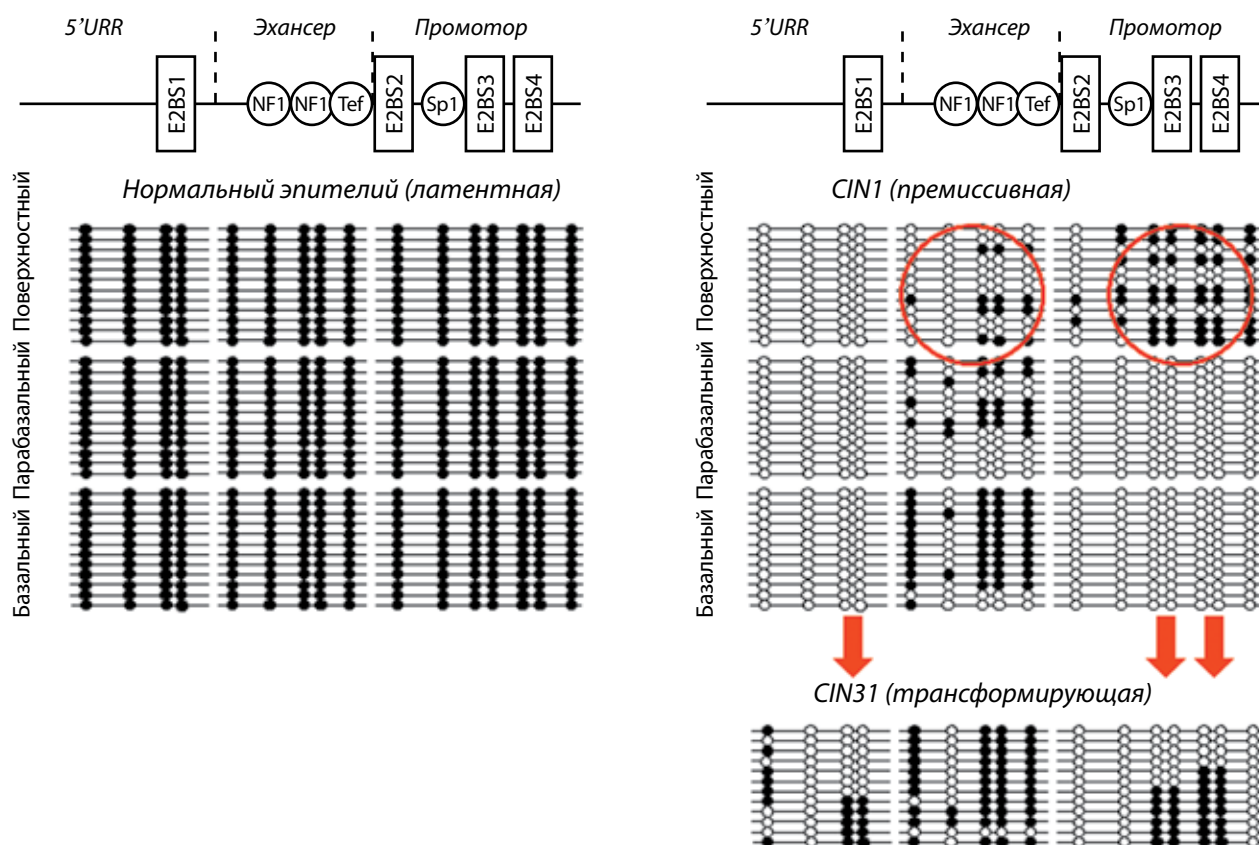


Рис. 3. Изменение паттерна метилирования во время латентной, продуктивной и трансформирующей инфекции [по 69]. Статус метилирования регуляторного участка HPV 16-го типа определяли методом бисульфитного секвенирования. Из микродиссецированного эпителия шейки матки с различной степенью дифференцировки: базальный (низкодифференцированный), парабазаальный и поверхностный (терминально дифференцированный) были получены 12 клонов. В регуляторном участке HPV 16-го типа расположены 16 CpG-динуклеотидов. Белые и черные круги – неметилированные и метилированные CpG соответственно. При латентной инфекции все 16 CpG гиперметилированы независимо от степени дифференцировки эпителия. При перmissive инфекции паттерн метилирования существенно отличается от латентной инфекции. В низкодифференцированных базальных клетках энхансер частично метилирован, и в процессе дифференцировки происходит деметилирование вирусного энхансера. Вирусный промотор в базальных и парабазаальных клетках неметилирован. В высокодифференцированных поверхностных слоях эпителия происходит гиперметилирование промотора, которое, возможно, связано с супрессией раннего промотора в поверхностных слоях эпителия. Процесс трансформации эпителия ассоциирован с метилированием 3 из 4 сайтов связывания вирусных регуляторных белков E2BS-1, -3 и -4, указанных красными стрелками

предопухолевых стадий развития рака шейки матки и других HPV-ассоциированных опухолей. В связи с этим перспективным и актуальным является изучение роли метилирования ДНК в регуляции генома HPV. Деметилирующие агенты могут стать новыми и сравнительно дешевыми препаратами для лечения интра-

эпителиальных неоплазий и профилактики развития рака шейки матки и других HPV-ассоциированных заболеваний.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 15-04-07769а.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bernard H. U., Burk R. D., Chen Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401(1):70–9.
- Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518–27.
- Doorbar J., Egawa N., Griffin H. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 2015;25:2–23.
- Doorbar J., Quint W., Banks L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:55–70.
- Kalantari M., Lee D., Calleja-Macias I. E. et al. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. *Virology* 2008;374(2):292–303.
- Goon P., Sonnex C., Jani P. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265(2):147–51.
- Howley P. M., Pfister H. J. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. *Virology* 2015;479–480:290–6.

8. Howley P.M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006;117:113–26.
9. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690–8.
10. Chow L.T., Broker T.R., Steinberg B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010;118(6–7):422–49.
11. Schiller J.T., Day P.M., Kines R.C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 2010;118:S12–7.
12. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol* 2013;3(4):416–21.
13. Doeberitz M., Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res* 2009;40(6):435–42.
14. Kajitani N., Satsuka A., Kawate A., Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol* 2012;3:152.
15. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009;384(2):375–9.
16. Demeret C., Desaintes C., Yaniv M., Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 1997;71(12):9343–9.
17. Dostatni N., Lambert P.F., Sousa R. et al. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 1991;5(9):1657–71.
18. Dong G., Broker T.R., Chow L.T. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 1994;68(2):1115–27.
19. Rapp B., Pawellek A., Kraetzer F. et al. Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J Virol* 1997;71:6956–66.
20. Steger G., Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 1997;71(1):50–8.
21. Hebner C.M., Laimins L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006;16(2):83–97.
22. Cheng S., Schmidt-Grimminger D.C., Murant T. et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995;9(19):2335–49.
23. Bodily J., Laimins L.A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011;19(1):33–9.
24. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32(Suppl 1):7–15.
25. Meyers C., Mayer T.J., Ozbun M.A. Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol* 1997;71(10):7381–6.
26. Ozbun M.A., Meyers C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 1997;71(7):5161–72.
27. Gariglio P., Gutierrez J., Cortes E., Vázquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 2009;40(6):449–65.
28. Duensing A., Spardy N., Chatterjee P. et al. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environ Mol Mutagen* 2009;50(8):741–7.
29. Moody C.A., Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10(8):550–60.
30. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212(4):356–67.
31. Woodman C.B., Collins S.I., Young L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7(1):11–22.
32. Vinokurova S., Wentzensen N., Kraus I. et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 2008;68(1):307–13.
33. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59(24):6132–6.
34. Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V. et al. HPV infection in cervical-cancer cases in Russia. *Int J Cancer* 1995;61(3):337–41.
35. Arias-Pulido H., Peyton C.L., Joste N.E. et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2006;44(5):1755–62.
36. Sano T., Oyama T., Kashiwabara K. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6):1741–8.
37. Wentzensen N., von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007;23(4):315–30.
38. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276–84.
39. Bird A. DNA methylation de novo. *Science* 1999;286(5448):2287–8.
40. Bird A.P. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87–101.
41. Boyes J., Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 1991;64:1123–34.
42. Kass S.U., Pruss D., Wolffe A.P. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;13:444–9.
43. Siegfried Z., Eden S., Mendelsohn M. et al. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 1999;22(2):203–6.
44. Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res* 2004;105(2–4):325–34.
45. Lund A.H., van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004;18(19):2315–35.
46. Baylin S.B., Ohm J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6(2):107–16.
47. Shenker N., Flanagan J.M. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. *Br J Cancer* 2012;106(2):248–53.
48. Maunakea A.K., Nagarajan R.P., Bilenky M. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 2010;466(7303):253–7.
49. Lorincz M.C., Dickerson D.R., Schmitt M., Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(11):1068–75.
50. Choi J.K., Bae J.B., Lyu J. et al. Nucleosome deposition and DNA methylation at coding region boundaries. *Genome Biol* 2009;10(9):R89.
51. Diniz S.N., Pendelosi K.P., Morgun A. et al. Tissue-specific expression of IL-15RA alternative splicing transcripts and its regulation by DNA methylation. *Eur Cytokine Netw* 2010;21(4):308–18.
52. Oberdoerffer S. A conserved role for intragenic DNA methylation in alternative pre-mRNA splicing. *Transcription* 2012;3(3):106–9.
53. Shukla S., Kavak E., Gregory M. et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 2011;479(7371):74–9.
54. Salem C., Liang G., Tsai Y.C. et al. Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 2000;60(9):2473–6.
55. Smith I.M., Mydlarz W.K., Mithani S.K., Califano J.A. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer* 2007;121(8):1724–8.
56. Karlin S., Doerfler W., Cardon L.R. Why is CpG suppressed in the genomes

of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *J Virol* 1994;68(5):2889–97.

57. Galvan S.C., Martinez-Salazar M., Galvan V.M. et al. Analysis of CpG methylation sites and CGI among human papillomavirus DNA genomes. *BMC Genomics* 2011;12:580.

58. Sanchez I.E., Dellarole M., Gaston K., de Prat Gay G. Comprehensive comparison of the interaction of the E2 master regulator with its cognate target DNA sites in 73 human papillomavirus types by sequence statistics. *Nucleic Acids Res* 2008;36(3):756–69.

59. Rosl F., Arab A., Klevenz B. et al. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 5):791–801.

60. Thain A., Jenkins O., Clarke A.R., Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996;70(10):7233–5.

61. Kim K., Garner-Hamrick P.A., Fisher C. et al. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 2003;77(23):12450–9.

62. Fernandez A.F., Rosales C., Lopez-Nieva P. et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 2009;19(3):438–51.

63. Bhattacharjee B., Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006;354(2):280–5.

64. Brandsma J.L., Sun Y., Lizardi P.M. et al. Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology* 2009;389(1–2):100–7.

65. Kalantari M., Calleja-Macias I.E., Tewari D. et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;78(23):12762–72.

66. Kalantari M., Chase D.M., Tewari K.S., Bernard H.U. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of *L1* gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. *J Med Virol* 2010;82(2):311–20.

67. Mirabello L., Schiffman M., Ghosh A. et al. Elevated methylation of HPV 16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2013;132(6):1412–22.

68. Mirabello L., Sun C., Ghosh A. et al. Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(7):556–65.

69. Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* 2011;6(9):e24451.

70. Chaiwongkot A., Vinokurova S., Pientong C. et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer* 2013;132(9):2087–94.

71. Wooldridge T.R., Laimins L.A. Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology* 2008;374(2):371–80.

Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы

З.Н. Никифорова¹, И.А. Кудрявцев¹, Н.Е. Арноцкая¹, И.С. Брюховецкий^{2,3}, В.Е. Шевченко¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Школа биомедицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»;

Россия, 690091, Владивосток, ул. Суханова, 8;

³ФГБУН «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук;

Россия, 690059, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Контакты: Зоя Николаевна Никифорова zojanik@rambler.ru

Мультиформная глиобластома IV степени злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения является наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга с медианой выживаемости примерно 15–25 мес после лечения. Опухоль после хирургического лечения часто рецидивирует и резистентна к химио- и лучевой терапии. Мультиформная глиобластома представляет собой высокодифференцированную гетерогенную клеточную популяцию, способную образовывать опухолевые стволовые клетки (ОСК), и подразделяется на 4 молекулярных подтипа: proneйральный, нейральный, классический и мезенхимальный. Несмотря на ряд успехов в изучении механизмов, приводящих к образованию наиболее злокачественных подтипов опухоли, не ясны.

Цель работы — обобщение современных сведений о роли и биологических особенностях ОСК в опухолевой прогрессии и патогенезе мультиформной глиобластомы.

Способность ОСК к образованию ниш с клетками эндотелия и микроокружением объясняет их основные свойства: пластичность фенотипа, адгезию, выживание и резистентность к стандартному противоопухолевому лечению. Наличие aberrантных сигнальных путей (Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR) как в самой опухоли, так и в популяции ОСК, дисрегуляция микроРНК (miR-21, miR-128, miR-326, miR-34a и др.), влияние эпителиально-мезенхимального перехода объясняют характерные биологические характеристики ОСК. При разработке препаратов, направленных против ОСК, нужно учитывать влияние проводимой терапии и на нормальные стволовые клетки. Найденные за последнее десятилетие регуляторные механизмы и маркеры могут служить основой для создания новых лекарственных препаратов таргетного действия при лечении мультиформных глиобластом.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, опухолевая стволовая клетка, маркер CD133+, Notch-сигнальный путь, Hedgehog-Gli-сигнальный путь, Wnt/ β -катенин-сигнальный путь, TGF- β /SMAD-сигнальный путь, эпителиально-мезенхимальный переход, микроРНК

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-26–33

Tumor stem cells from glioblastoma multiforme

Z.N. Nikiforova¹, I.A. Kudryavtsev¹, N.E. Arnotskaya¹, I.S. Bryukhovetskiy^{2,3}, V.E. Shevchenko¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Biomedicine School, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok, 690091, Russia;

³A.V. Zhirmunskiy Institute of Sea Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences;

17 Pal'chevskogo St., Vladivostok, 690059, Russia

Glioblastoma multiforme, a World Health Organization grade IV malignant glioma, is the most common and lethal primary brain tumor with the median survival of approximately 15–25 months after treatment. Glioblastoma multiforme has been shown to be resistant to radiotherapy and chemotherapy and invariably recurs following surgical resection and chemoradiation. The characteristics of this tumor are exemplified by heterogeneous cell population with diverse biologic properties and genetic changes, the ability to form cancer stem cells (CSC) and divided into four molecular subtypes — proneural, neural, classical and mesenchymal. Despite some success, the mechanisms leading to the formation of the most malignant tumor subtype are unclear. The aim of this review was a synthesis of modern information about the role and biological characteristics of tumor stem cells in tumor progression and the pathogenesis of glioblastoma multiforme. CSCs reside in niches, which are anatomically distinct regions within the tumor microenvironment. These niches maintain the principle properties of CSCs, preserve their phenotypic plasticity, adhesion, survival, resistance to standard cancer treatment and metastatic potential. The presence of aberrant signaling pathways (Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -catenin, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR), both in the tumor and in the population of CSC, the dysregulation of microRNAs (miR-21, miR-128, miR-326, miR-34a), influence of epithelial-to-mesenchymal transition explains the availability of typical biological characteristics of the CSC. One needs to consider the influence of the therapy on normal stem cells in the development of drugs directed against the CSC. Regulatory mechanisms and markers found over the last decade can be used as the basis for creation of the new drugs with targeted action in the treatment of glioblastoma multiforme.

Key words: glioblastoma multiforme, cancer stem cell, CD 133+ marker, Notch-signaling pathway, Hedgehog-Gli-signaling pathway, Wnt/ β -catenin-signaling pathway, TGF- β /SMAD-signaling pathway, epithelial — mesenchymal transition, microRNA

Введение

Наиболее распространенная и злокачественная первичная опухоль центральной нервной системы — мультиформная глиобластома, или астроцитомы, IV степени злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения [1]. Мультиформная глиобластома является одной из первых патологий, чей геномный профиль был отражен в проекте TCGA (The Cancer Genome Atlas), она характеризуется гетерогенной клеточной популяцией с различными биологическими свойствами и генетическими изменениями [2, 3]. Выделяют 4 молекулярных подтипа глиобластом: proneurальный, нейральный, классический и мезенхимальный [1, 3]. Данная опухоль представляет собой гетерогенную клеточную популяцию с различными биологическими свойствами и генетическими изменениями [2]. В настоящее время, несмотря на прогресс в терапии (химио-, лучевая терапия), прогноз для больных глиобластомой — один из самых неблагоприятных в онкологии [3, 4]. Резистентность к противоопухолевому лечению связывают с 1–5 % популяцией клеток, которые называют опухолевые стволовые клетки (ОСК) [1, 4]. Впервые ОСК были обнаружены при остром миелоидном лейкозе. Затем они были выявлены при раке молочной железы и центральной нервной системы. Нейральные стволовые и нейральные прогениторные клетки головного мозга человека рассматриваются большинством исследователей как наиболее вероятный источник возникновения злокачественных глиом [5].

В организме стволовые клетки обнаруживают в нишах, представляющих собой анатомическую субъединицу тканевого компартмента [6]. ОСК активно взаимодействуют с микроокружением ниши, интактными структурами головного мозга и используют их в глиомогенезе. В нишах ОСК подвергаются дифференцировке и образуют гетерогенную популяцию опухолевых клеток. Это объясняет существование популяции клеток с различным опухолевым потенциалом. В нишах обеспечивается самоподдержание и длительное пребывание ОСК в состоянии покоя. Взаимодействие клеток эндотелия и ОСК в нишах обеспечивают сигнальные пути (Notch), факторы роста (VEGF) и микроРНК [7].

Таким образом, ОСК имеют ряд особенностей, понимание которых может иметь большое значение для совершенствования подходов при создании инновационных технологий противоопухолевой терапии злокачественных глиом [8]. Хотя ОСК проходят такие же пути пролиферации и дифференцировки, как и нормальные стволовые клетки, они участвуют в стимуляции канцерогенеза: появляется все больше доказательств того, что они способствуют прогрессии [9] и метастазированию опухоли [10]. Эти клетки вызывают развитие опухоли у иммунокомпрометированных мышей и дифференцируются в клетки, образующие опухоль [11, 12]. ОСК обладают высокой способно-

стью к инвазии, стимулируют образование кровеносных сосудов как внутри опухолевого очага, так и по периферии, выделяют факторы подвижности клеток [6, 13, 14], а также характеризуются наличием резистентности к химио- и радиотерапии из-за гиперэкспрессии генов множественной лекарственной устойчивости.

Молекулярные маркеры опухолевых стволовых клеток мультиформной глиобластомы

ОСК выявляют по способности экспрессировать CD133 — белок клеточной поверхности 120 кДа — известный как проминин 1, который также является маркером нейральных стволовых клеток человека [15, 16]. Помимо CD133 на своей поверхности ОСК экспрессируют CD15, A2B5, молекулы адгезии L1CAM [16], нестин, подоплатин (PDPN) и интегрин альфа 6 (CD49f) [17] (табл. 1). В процессах миграции, инвазии и индукции роста опухоли активное участие принимают металлопротеиназы MMP-2 и MT-1MMP, экспрессирующиеся ОСК глиобластомы.

Нормальная стволовая клетка может трансформироваться в ОСК через нарушение путей пролиферации и дифференцировки, контролирующих ее. В патогенез мультиформной глиобластомы вовлечены гены (*PTEN*, *EGFR*, *p53*, *CDK4*, *CDKN2A/B*, *MDM2*, *MDM4*, *PTEN*, *PDGFR*, *PDGFRA*, *GLI1*, *NF1*, *RB1*, *KIT*, *PI3K*, *PIK3C2B*), регулирующие пролиферацию, апоптоз, клеточный цикл (см. табл. 1) [1, 2]. Один из важнейших онкосупрессоров *PTEN* активно вовлечен в процессы нейрогенеза в мозге взрослого человека [24]. Мутантный белок p53 в стволовых клетках мультиформной глиобластомы аналогичен таковому в нейральных стволовых и прогениторных клетках [25]. Изменения в сигнальном пути p53 включают мутации и делеции из *p53*, гомозиготную делецию *CDKN2A* и амплификации *MDM2* и *MDM4* [1, 26].

Описана комплексная роль генов *p53* и *PTEN* в процессах обновления и дифференцировки в нормальных нейральных и неопластических стволовых клетках [27, 28]. Регуляторы взрослого нейрогенеза *SOX2* и *SOX21* играют ключевую роль в пролиферации неопластических клеток, одновременно их инактивация останавливает рост глиомы *in vivo* [16, 29, 30].

Идентифицированы новые онкогены, участвующие в патогенезе глиобластом, включая *AGAP2/CENTG*, которые являются активаторами PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути [26].

Роль эпителиально-мезенхимального перехода в патогенезе мультиформной глиобластомы

Накапливается все больше доказательств того, что приобретение фенотипа стволовых клеток тесно связано с изменениями, происходящими при эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) [31–38]. При мезенхимальном подтипе мультиформной глиобластомы, как правило, экспрессируются маркеры стволовых

Таблица 1. Маркеры стволовых клеток при мультиформной глиобластоме [по 1, 17–23]

Маркер	Тип	Связь с канцерогенезом
CD133	Гликопротеин	Ассоциирован с более агрессивными типами опухоли
L1CAM (CD171)	Маркер клеточной адгезии	Необходим для поддержания роста и выживания CD133+ ОСК
CD44	Маркер клеточной поверхности	Ассоциирован с более агрессивными типами опухоли, локализуется вместе с Id1 в нишах эндотелиальных стволовых клетках
CD34	Мембранный белок, маркер межклеточной адгезии	Идентифицирован в митотически активных клетках большинства видов глиом CD34, опосредует связывание стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или напрямую со стромальными клетками
A2B5	Гликозид клеточной поверхности	Противоречивые данные о связи с более агрессивными типами глиобластомы
ID1	Фактор транскрипции	Участие в самообновлении опухолевых стволовых клеток
CD15 (aka-SSEA-1 или LeX)	Белок клеточной поверхности	Маркер стволовых клеток в опухолях негативных по CD133
Нестин	Белок клеточной поверхности	Служит важным идентификатором всех типов стволовых клеток
<i>Nanog</i>	Фактор транскрипции	Модуляция сферообразования, контроль пролиферации, инвазии
<i>Oct4</i>	Фактор транскрипции	Инвазия
<i>SOX2</i>	Фактор транскрипции	Один из маркеров пронеурального субтипа глиобластом. Образование нейросфер, инвазия
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	Фактор роста	Ангиогенез, канцерогенез. Экспрессия увеличивается в условиях гипоксии через активацию HIF-пути. Неблагоприятный прогноз у пациентов
stromal-derived factor-1 (SDF1)	Хемокин	Обуславливает фенотип глиобластомы с инвазивными свойствами, стимуляция ангиогенеза в преваскулярных нишах. Пролиферации через паракринные системы. Образуется в условиях гипоксии при активации PI3K/Akt- и ERK1/2-сигнальных путей
Интегрин альфа 6 (CD49f)	Гликопротеин из надсемейства интегринов	Формирование межклеточных связей, маркер преваскулярных ниш, участвует в прогрессии заболевания
Подопланин (PDPN)	Трансмембранный гликопротеин	Инвазия
Интегрин 6	Трансмембранный рецептор	Регуляция самообновления, пролиферации и образования опухоли при взаимодействии с внеклеточным матриксом

клеток, связанные с агрессивным фенотипом опухоли (CD44) [31]. По сравнению с пронеуральным, мезенхимальный подтип заболевания характеризуется неблагоприятным прогнозом и формированием резистентности к стандартной химиолучевой терапии. Подробно описано, что ЭМП играет важную роль в преобразовании как нормальных, так и опухолевых эпителиальных клеток в производные с фенотипом наподобие мезенхимальному [35]. В результате ЭМП клетки приобретает свойства, присущие низкодифференцированным опухолям, включая подвижность, способность к инвазии и повышение устойчивости к апоптозу, связанные с метастазированием и прогрессированием опухоли [36]. ЭМП регулируется факторами транскрипции *SNAIL*, *TWIST* и *ZEB*, дисрегуляция которых связана с опухолевой инвазией и плохим клиническим прогнозом при мультиформной глиобластоме (табл. 2) [25, 31, 34, 39]. *SNAIL*, *TWIST* и *ZEB* подав-

ляют экспрессию Е-кадгерина, замещая его маркерами мезенхимального фенотипа (N-кадгерин, виментин). Таким образом, экспрессия маркеров мезенхимального фенотипа мультиформной глиобластомы связана с наиболее негативным прогнозом у пациентов и развитием резистентности к стандартной терапии [31].

Нейральные стволовые клетки и ОСК используют для поддержания и выживания одни и те же сигнальные пути: Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR, MAPK и STAT3, которые взаимосвязаны между собой и могут способствовать развитию лекарственной резистентности и рецидивированию мультиформной глиобластомы. Важную роль в этом процессе играет трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1) — один из основных регуляторов 3-го типа (инвазивного) ЭМП [37]. Известно, что TGF- β 1 активирует сигнальные пути, участвующие в ЭМП, в частности сигнальный путь TGF- β /SMAD [38].

Таблица 2. Молекулярные маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, участвующие в патогенезе мультиформной глиобластомы [по 25, 31, 34, 39]

Ген, фактор транскрипции, белок эпителиально-мезенхимального перехода	Функция	Роль в патогенезе мультиформной глиобластомы
<i>TWIST</i>	Фактор, ускоряющий ЭМП	Усиление инвазии
CD29, CD44, CD90, CD105	MSC-белки	Сверхэкспрессия в клеточных линиях глиобластом
<i>YKL-40</i> , <i>TNC</i> , остеонектин <i>STAT3</i>	Регуляция ЭМП	Инфильтрация и опухолевый рост
<i>TAGLN2</i> , <i>IGFBP2</i> , <i>IGFBP3</i> , <i>POSTN</i> , <i>TNC</i> , <i>TGF-β1</i>	Маркеры ЭМП при раке молочной железы	Предикторы прогноза заболевания
<i>SNAI1</i>	Промоция ЭМП	Высоко экспрессирован при глиомах. При прогрессировании заболевания экспрессия увеличивается. Пролиферация клеток и инфильтрирующий рост опухоли
<i>SIP1</i>	Индуктор ЭМП	Инвазия, образование клонов
<i>CXCR4</i>	MSC-маркер	Усиление миграции. Влияет на экспрессию маркеров ЭМП
<i>ZEB2</i>	Фактор транскрипции	Экспрессия повышена, корреляция с гистологической градацией глиобластомы

Сигнальный путь TGF-β/SMAD, включающий 8 факторов транскрипции, вовлечен в развитие и прогрессирование опухолей головного мозга [40]. Основным регулятор инвазивной фазы ЭМП TGF-β1 связывается с рецепторами I и II типа, которые, в свою очередь, фосфорилируют рецептор-регулируемые сигнальные белки SMAD (r-SMADs), SMAD2 и SMAD3 [41], соединяющиеся со SMAD4. Такой комплекс белков транслоцируется в ядро клетки [41], где они регулируют экспрессию специфичных генов через связывание участков промоторов. Известно, что SMAD2 является медиатором клеточного сигнала от TGF-β и регулирует множество клеточных процессов (клеточная пролиферация, апоптоз, дифференциация клеток).

Исследования последних лет подтверждают ключевую роль TGF-β1 как фактора роста ОСК глиобластом [37, 42]. Экспрессия этого белка в злокачественных глиомах увеличена [40]. Предполагается, что TGF-β1 обеспечивает сигналинг в нишах ОСК. TGF-β1-рецепторы локализованы в межклеточных контактах и усиливают синтез белков межклеточного матрикса [40]. Под действием секретируемого TGF-β1 ОСК образуют ниши с клетками эндотелия через SDF-1/CXCR4-зависимый путь [21, 29], а также дифференцируются в клетки, напоминающие перициты и, обеспечивающие периваскулярную нишу питанием [7].

TGF-β1 влияет на свойства ОСК через 2 независимых пути: TGF-β—LIF, через который уменьшается экспрессия E-кадгерина, и TGF-β—SOX4—SOX2. Известно, что TGF-β1 оказывает влияние на таргетные гены через SMAD-независимые пути, такие как RAS, MAPK, PI3K, Notch, Wnt.

Также известно, что TGF-β1 индуцирует ЭМП, миграцию клеток и метастазирование. Ингибиторы TGF-β1 влияют на образование сфер глиобластомы в условиях *in vitro* и на размеры опухоли в условиях *in vivo*, воздей-

ствуют на количественный состав популяции клеток, положительных по нестину и CD133+ [40].

Сигнальный путь Notch хорошо известен как регулятор специфической дифференцировки, пролиферации, жизнеспособности и миграционной активности клеток. Его роль в контроле пролиферации и дифференцировки стволовых клеток продемонстрирована для нескольких типов клеток, включая гемопоэтические и нейральные стволовые клетки. Трансмембранные белки Notch-зависимого пути действуют в опухолях как онкогены. Аберрантная активация сигнального пути Notch была обнаружена и при глиобластоме [15]. Показана связь ОСК с сигнальным путем Notch: ингибирование этого каскада белков приводило к снижению образования нейросфер [43]. Кроме того, сверхэкспрессия *Notch* в мышинной модели *K-ras*-индуцированной глиобластомы приводила к увеличению уровня нестина, а также вызывала образование опухоли в субэпендимальной зоне головного мозга. Сигнальный путь связан с резистентностью ОСК при радиационной терапии [44].

Х. Fan и соавт. показали, что блокирование этого сигнального пути ингибитором γ-секретазы снижает количество CD133+ ОСК мультиформной глиобластомы [45]. Ингибиторы γ-секретазы проходят 1-е этапы клинических испытаний. DNER (Delta/Notch-like epidermal growth factor-related receptor) и DLL4 (Notch ligand Delta-like 4) также вовлечены в регуляцию опухолевого роста глиобластом. Терапия, направленная на подавление экспрессии *DLL4*, показала положительный эффект, но продолжительное ингибирование *DLL4* вызывает рост опухоли. Регуляторы сигналинга ID4 (ингибитор дифференциации 4) и CXCR4 задействованы в сигнальном пути Notch при патогенезе опухолей головного мозга. Тем не менее их роль в ОСК глиобластомы до конца не ясна [37].

Сигнальный путь Wnt — внутриклеточный сигнальный путь, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей. Через этот сигнальный путь регулируется самообновление стволовых клеток и индукция ЭМП опухолевых клеток. Сверхэкспрессия лигандов Wnt или супрессия эндогенных ингибиторов Wnt наблюдается при многих типах рака человека, в том числе при раке толстой кишки, молочной железы, глиобластоме; в последнем случае — связана с активацией ЭМП [46]. Активация сигнального пути Wnt инициируется связыванием лигандов Wnt (обычно Wnt1 или Wnt3a) с рецепторами клеточной поверхности, состоящих из Frizzled (Fzd), LDL и рецепторсвязанных белков LRP5 или LRP6.

Активация Wnt приводит к ингибированию GSK-3 β , стабилизации и транслокации в ядро β -катенина, который образует комплекс с факторами транскрипции TCF/LEF и регулирует транскрипцию генов-мишеней Wnt [47]. Переход β -катенина в ядро приводит к снижению экспрессии Е-кадгерина и сопровождается прогрессированием опухолевого заболевания под влиянием метастазов, что связано с приобретением опухолью мезенхимального фенотипа при многих солидных новообразованиях [35, 48]. Большинство мультиформных глиобластом не экспрессируют Е-кадгерин, тем не менее при инвазивных формах β -катенин находят в ядре. Известно, что β -катенин предложен в качестве прогностического маркера при глиобластоме и астроцитомах, так как уровни его матричной РНК (мРНК) и белка были увеличены и коррелируют со степенью злокачественности [35].

Активированный β -катенин участвует в канцерогенезе и приводит к усиленному самообновлению стволовых клеток и пролиферации. Несколько протоонкогенов способствуют росту глиобластомы и увеличению популяции ОСК через активацию TCF-4, компонента сигнального пути Wnt. В качестве регуляторов сигнального пути Wnt исследуют ингибиторы его компонентов и их рецепторов. Инициацию сигналинга Wnt предотвращают DKK1–4 и WIF1 за счет нарушения взаимодействия лигандов Wnt и Fzd-рецепторов и корецепторов LRP5–6. Обработка клеток глиобластомы белком secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4) модулирует ЭМП через сигнальный путь Wnt/ β -катенин и активирует уровни экспрессии SNAIL, способствуя приобретению мезенхимального фенотипа при глиобластомах [46]. GSK-3 β регулирует стабильность и активность β -катенина и других факторов транскрипции, связанных с ЭМП, таких как SNAIL1 [49]. Этот сигнальный путь также вовлечен в формирование резистентности при терапии глиобластомы. Результаты последних исследований могут использоваться для разработки новых подходов при химиотерапевтическом лечении мультиформной глиобластомы.

Сигнальный путь Sonic Hedgehog (SHH) включает в себя семейство секретируемых белков, играющих ключевую роль в морфогенезе органов и тканей. Hed-

gehog-сигнальный путь регулирует тканевую полярность и популяцию стволовых клеток [39]. Транскрипционные факторы *Gli*, которые регулируются SHH, берут свое название от глиом, где они обычно экспрессируются. В мозге SHH-сигналинг отвечает за поддержание ниш для нейральных стволовых клеток в нейрогенных областях. *Gli* оказывают активное влияние на процессы химиорезистентности. На моделях мышей была показана корреляция активности *Gli* с градацией мультиформных глиобластом [29]. Несколько научных групп исследовали роль Hedgehog-Gli в регуляции сигналинга ОСК и обнаружили, что этот сигнальный путь регулирует самообновление и образование ОСК в опухоли [16, 17, 29]. Между сигнальными путями SHH и Wnt существует взаимосвязь. Они оба обычно гиперактивируются в опухолях и поддерживают опухолевый рост, участвуют в корегуляции нейральных стволовых клеток. Факторы транскрипции *Gli* участвуют в регуляции ЭМП через гены *SNAIL1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST2* [50] и *FOXC2*. *Gli1* способствует передаче β -катенина в ядро через *SNAIL1* и Е-кадгерин [51].

В настоящее время доступны фармакологические ингибиторы SHH-пути, такие как циклопамин и его растворимый аналог. Циклопамин подавляет пролиферацию и клоногенную способность клеток глиобластомы, что приводит к снижению экспрессии транскрипционных факторов *Nanog*, *SOX2* и *Oct4*. Кроме того, лечение циклопамином улучшает эффективность лучевой терапии [39]. Таким образом, ингибиторы SHH-сигнального пути могут улучшать эффективность традиционной терапии мультиформной глиобластомы. Тем не менее необходимо оценивать влияние этих ингибиторов на нормальные стволовые клетки. В клинических исследованиях с Hedgehog-ингибитором GDC-0449 [52] были получены хорошие результаты с низкой токсичностью у больных медуллобластомой головного мозга.

Регуляторные функции микроРНК

МикроРНК представляют собой класс некодирующих РНК, состоящих из 22 нуклеотидов и играющих важную роль в регуляции генов-мишеней. Согласно современным представлениям количество микроРНК составляет ~1 % от генома высших эукариот и регулирует 10–30 % генов [53–63].

МикроРНК обуславливают процессы пролиферации, миграции, инвазии различных типов опухолей, включая мультиформную глиобластому [54]. На данный момент известно о 95 микроРНК с пониженной и о 255 с повышенной экспрессией при множественной глиобластоме [55]. В других исследованиях выявлены 43 aberrантных микроРНК (miR-21, miR-128, miR-326, miR-34a), экспрессирующихся в глиомах и связанных с пролиферацией, инвазией ОСК глиобластом [55–63]. Так, при гиперэкспрессии miR-128 поддерживается образование нейросфер в культуре клеток [56].

Известно, что микроРНК осуществляют регуляцию трансляционной эффективности мРНК или скорости деградации мРНК за счет комплементарного связывания с мишенью. МикроРНК влияют напрямую на онкогенез или через сигнальные пути Notch (miR-146a) и TGF- β /SMAD (miR-18a, miR-21, miR-451), через которые модулируется миграция, пролиферация, инвазия и ответ на химиотерапевтическое лечение при мультиформной глиобластоме. Кроме того, микроРНК влияют на экспрессию эпидермального и тромбоцитарного факторов роста (PDGF, EGFR) и *PTEN*, которые вовлечены в патогенез глиобластомы.

Экспрессия онкогенной miR-21 при мультиформной глиобластоме повышена. Ее регуляция связана с сигнальными путями TGF- β /SMAD и p53. На моделях клеточных линий показано ее негативное влияние на экспрессию опухолевых супрессоров, включая p53, Bax, DAXX, APAF1, p21, Trp63 и TGFBR2 [55]. Она регулирует экспрессию MMP-2, коэкспрессируется с *SOX2*, способствуя инвазии и ангиогенезу, ее высокие уровни связаны с плохой выживаемостью пациентов. [31]. Аналогичным образом при избыточной экспрессии miR-21 наблюдали снижение маркеров нейральных стволовых клеток — нестина, *TUJ1* — и повышение экспрессии маркера астроцитов *GFAP*. Показана роль miR-21 в поддержании стволовости клеток [57]. Подавление miR-21 приводит к заметному увеличению экспрессии *PTEN*. Кроме того, трансфекция с антимысловой miR-21 приводит к значительному повышению чувствительности клеточных линий U-251, U87MG к радиационной и химиотерапии [58].

В ОСК онкогенные miR-221/222 гиперэкспрессированы, что ассоциируется с активацией факторов транскрипции NF- κ B и c-Jun. Их гиперэкспрессия вызывает снижение образования коннексина 43 (GJA1), основного компонента щелевых контактов, что влияет на пролиферацию и инвазию. И наоборот, ингибирование miR-221/222 усиливает экспрессию нестина [57].

Восстановление функционирования miR-153 в ОСК глиобластомы приводит к дифференцировке ОСК.

Опухолевые супрессоры, такие как miR-7, miR-23b, miR-34a, miR-101, miR-124a, miR-137, miR-146b, miR-195, miR-302/367 и miR-410, предотвращают инвазию и пролиферацию ОСК при глиобластоме [31]. Амплификация *EGFR* и делеция miR-34 связаны с укороченным

периодом продолжительности жизни у больных мультиформной глиобластомой [59]. Трансфекция miR-34a в ОСК приводит к снижению пролиферации и выживаемости клеток, миграции, а также к уменьшению экспрессии CD133 и нестина [60, 61]; miR-137 также ингибирует самообновление и дифференцировку ОСК глиобластомы через снижение уровней *Oct4*, *Nanog* и *SOX2* [62]. Гиперэкспрессия miR-128a, miR-504, miR-124a и miR-184 коррелирует с уменьшением мезенхимальных маркеров при множественной глиобластоме, что влияет на более благоприятный прогноз у пациентов [63].

Эти данные подчеркивают особую роль микроРНК в патогенезе мультиформной глиобластомы, а также их прогностическое значение. Большое значение имеет разработка диагностических наборов известных aberrантных микроРНК в диагностике мультиформной глиобластомы.

Заключение

В настоящее время большое значение в патогенезе мультиформной глиобластомы придают ОСК. Их способность к самоподдержанию, адгезии, выживанию, резистентности к стандартному противоопухолевому лечению зачастую обусловлена возможностью образовывать и поддерживать ниши с характерным микроокружением и васкуляризацией. Измененные сигнальные пути (Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR) и экспрессия молекулярных маркеров (CD49f, SDF1, VEGF, CD44, CD34) направлены на поддержание существования ниш ОСК мультиформной глиобластомы. Большое значение приобретает разработка более эффективных методов лечения для преодоления химио- и лучевой резистентности ингибиторами сигнальных путей, а также модуляцией микроРНК. Ингибиторы γ -секретазы и SHN-сигнального пути (циклопамин, GDC-0449) исследованы и в настоящее время проходят 1-е этапы клинических испытаний. Важно отметить, что при разработке препаратов, направленных против ОСК, нужно учитывать влияние проводимой терапии на нормальные стволовые клетки. Дальнейшие исследования необходимы для улучшения понимания роли ОСК в опухолеобразовании и для разработки новых подходов к терапии мультиформной глиобластомы с участием препаратов, направленных против ОСК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jhanwar-Uniyal M., Labagnara M., Friedman M. et al. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers (Basel)* 2015;7(2):538–55.
2. Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye A.H. Molecular subtypes, stem cells

- and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci* 2015;22(8):1219–26.
3. Wang X., Venugopal C., Singh S.K. Cancer stem cells in brain cancer. In: *Cancer stem cells in solid tumors*. Ed. by Alison L. Allan.

- Springer Science, Business Media, 2011. Pp. 37–57. P. 465.
4. Inda M.M., Bonavia R., Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)* 2014;6(1):226–39.

5. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396–401.
6. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105–11.
7. Safa A.R., Saadatzahe M.R. Cohen-Gadol A.A. et al. Emerging targets for glioblastoma stem cell therapy. *J Biomed Res* 2016;30(1):19–31.
8. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В. и др. Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013;8(2):13–9. [Bryukhovetskiy I.S., Bryukhovetskiy A. S., Kumeyko V.V. et al. Stem cells in the cancerogenesis of the multiform glioblastoma. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya = Cell Transplantation and Tissue Engineering* 2013;8(2):13–9. (In Russ.)].
9. Dalerba P., Cho R.W., Clarke M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Ann Rev Med* 2007;58:267–84.
10. Wicha M.S. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5606–7.
11. Jordan C.T., Guzman M.L., Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006;355(12):1253–61.
12. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66(19):9339–44.
13. Safa A.R., Saadatzahe M.R., Cohen-Gadol A.A. et al. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis* 2015;2(2):152–63.
14. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011;17(3):313–9.
15. Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B.A. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):425–36.
16. Huang Z., Cheng L., Guryanova O.A. et al. Cancer stem cells in glioblastoma – molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 2010;1(7):638–55.
17. Candace A. Gilbert, Alonzo H. Ross. Glioma stem cells: cell culture, markers and targets for new combination therapies. In: *Cancer stem cells theories and practice*. Ed. by S. Shostak. 2011. P. 80.
18. Kalkan R. Glioblastoma stem cells as a new therapeutic target for glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol* 2015;9: 95–103.
19. Zbinden M., Duquet A., Lorente-Trigos A. et al. Nanog regulates glioma stem cells and is essential *in vivo* acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J* 2010;29(15):2659–74.
20. Wang S.C., Hong J.H., Hsueh C., Chiang C.S. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab Invest* 2012;92(1):151–62.
21. Xu C., Wu X., Zhu J. VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2. *Scientific World Journal* 2013;2013:1–8.
22. Berezovsky A.D., Poisson L.M., Cherba D. et al. SOX2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 2014;16(3):193–206.
23. Islam F., Gopalan V., Smith R.A., Lam A.K. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res* 2015;335(1):135–47.
24. Omari K.M., Dorovini-Zis K. CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD34+ T-cell adhesion to endothelium. *J Neuroimmunol* 2003;134(1–2):166–78.
25. Wang Y., Yang J., Zheng H. et al. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytes glioma in a murine model. *Cancer Cell* 2009;15(6):514–26.
26. Cerami E., Demir E., Schultz N. et al. Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PLoS One* 2010;5(2):e8918.
27. Zheng H., Ying H., Yan H. et al. P53 and PTEN control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 2008;455(7216):1129–33.
28. Holland E.C., Celestino J., Dai C. et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genet* 2000;25(1):55–7.
29. Schonberg D.L., Lubelski D., Miller T.E., Rich J.N. Brain tumor stem cells: molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol Aspects Med* 2014;39:82–101.
30. Annovazzi L., Mellai M., Caldera V. et al. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 2011;8(3):139–47.
31. Ortensi B., Setti M., Osti D., Pelicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(1):18.
32. Hugo H., Ackland M.L., Blick T. et al. Epithelial – mesenchymal and mesenchymal – epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007;213(2):374–83.
33. Kahlert U.D., Nikkha G., Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett* 2013;331(2):131–8.
34. Lee J.K., Joo K.M., Lee J. et al. Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Oncotargets Ther* 2014;7:1933–44.
35. Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* 2016;11(3):1615–20.
36. Nakada M., Kita D., Watanabe T. et al. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel)* 2011;3(3):3242–78.
37. Ikushima H., Todo T., Ino Y. et al. Autocrine TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009;5(5):504–14.
38. Heldin C.H., Landström M., Moustakas A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(2):166–76.
39. Merchant A.A., Matsui W. Targeting Hedgehog – a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010;16(12):3130–40.
40. Ikushima H., Miyazono K. TGF- β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010;10(6):415–24.
41. Ross S., Hill C.S. How the SMADs regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(3):383–408.
42. Peñuelas S., Anido J., Prieto-Sánchez R.M. et al. TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(4):315–27.
43. Kristoffersen K., Villingshoj M., Poulsen H.S., Stockhausen M.T. Level of NOTCH activation determines the effect on growth and stem cell-like features in glioblastoma multiforme neurosphere cultures. *Cancer Biol Ther* 2013;14(7):625–37.
44. Stockhausen M.T., Kristoffersen K., Poulsen H.S. NOTCH signaling and brain tumors. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:289–304.
45. Fan X., Khaki L., Zhu T.S. et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* 2010;28(1):5–16.
46. Bhuvanlakshmi G., Arfuso F., Millward M. et al. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits glioma stem-like cells by reversing epithelial to mesenchymal transition, inducing apoptosis and decreasing cancer stem cell properties. *PLoS One* 2015;10(6):e0127517.
47. Cadigan K.M., Peifer M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(2):a002881.
48. Wu Y., Zhou B.P. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;40(7):643–50.
49. Zhou B.P., Deng J., Xia W. et al. Dual regulation of SNAIL by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control

- of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004;6(10):931–40.
50. Li X., Deng W., Nail C.D. et al. SNAIL induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 2006;25(4):609–21.
51. Li X., Deng W., Lobo-Ruppert S.M., Ruppert J.M. Gli1 acts through SNAIL and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene* 2007;26(31):4489–98.
52. Rudin C.M., Hann C.L., Laterra J. et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009;361(12):1173–8.
53. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
54. Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31.
55. Brower J.V., Clark P.A., Lyon W., Kuo J.S. MicroRNAs in cancer: glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells. *Neurochem Int* 2014;77:68–77.
56. Godlewski J., Nowicki M.O., Bronisz A. et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008;68(22):9125–30.
57. Aldaz B., Sagardoy A., Nogueira L. et al. Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* 2013;8(10):e77098.
58. Moller H.G., Rasmussen A.P., Andersen H.H. et al. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol* 2013;47(1):131–44.
59. Yin D., Ogawa S., Kawamata N. et al. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2013;32(9):1155–63.
60. Guessous F., Zhang Y., Kofman A. et al. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* 2010;9(6):1031–6.
61. Li Y., Guessous F., Zhang Y. et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 2009;69(19):7569–76.
62. Bier A., Giladi N., Kronfeld N. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Oncotarget* 2013;4(5):665–76.
63. Ma X., Yoshimoto K., Guan Y. et al. Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. *Neuro Oncology* 2012;14(9):1153–62.

Изучение новых систем доставки противоопухолевых препаратов на основе наночастиц нитрида бора

И.Ю. Житняк¹, И.В. Сухорукова², А.М. Ковальский², А.Т. Матвеев², И.Н. Бычков³,
Д.В. Штанский², Н.А. Глушанкова¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Национальный исследовательский технологический университет «Московский институт стали и сплавов»;
Россия, 119991, Москва, Ленинский проспект, 4;

³ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.Н. Пирогова»;
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Наталия Александровна Глушанкова natglu@hotmail.com

Одной из главных проблем лечения онкологических заболеваний является множественная лекарственная устойчивость неопластических клеток, возникающая в результате опухолевой прогрессии. Перспективным подходом для решения этой проблемы может стать использование наночастиц, так как в этом случае химиопрепараты способны проникать в опухолевые клетки посредством эндоцитоза и концентрироваться в околоядерной области вне зоны действия мембранных транспортеров. Одно из направлений для создания наночастиц противоопухолевых препаратов — получение структур на основе нитрида бора, обладающего химической инертностью и высокой стойкостью к окислению. Наночастицы гексагонального нитрида бора размером 100–150 нм с гладкой и развитой поверхностью были получены методом химического осаждения из газовой фазы. Были отработаны условия загрузки наночастиц нитрида бора доксорубицином, которые позволили получить наноконъюгаты с содержанием доксорубина до 95 мкг/мг частиц. Показано, что наночастицы нитрида бора, нагруженные доксорубицином, стабильны при нейтральном pH, но эффективно высвобождают химиопрепарат в среде с pH 4,5–5,5. Для изучения взаимодействия наноконъюгатов с неопластическими клетками были использованы культуры чувствительных к доксорубину линий IAR-6-1, KB-3-1, K562 и линий с множественной лекарственной устойчивостью KB-8-5 и IS-9. Конфокально-микроскопические исследования показали, что наноконъюгаты успешно проникают как в чувствительные, так и в резистентные к доксорубину клетки и накапливаются в околоядерной области. Выявлена колокализация наночастиц, нагруженных доксорубицином, с эндосомальным/лизосомальным компартментом клеток.

Ключевые слова: наночастицы нитрида бора, наноконъюгаты частиц нитрида бора с доксорубицином, конфокальная микроскопия, эндосома/лизосома

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-34–41

The study of new anticancer drug delivery system based on the boron nitride nanoparticles

I. Yu. Zhitnyak¹, I. V. Sukhorukova², A. M. Koval'skiy², A. T. Matveev², I. N. Bychkov³, D. V. Shtanskiy², N. A. Glushankova¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²National University of Science and Technology, Moscow Institute of Steel and Alloys; 4 Leninskiy prospekt, Moscow, 119049, Russia;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

The main problem in the treatment of many cancers is multidrug resistance due to tumor progression. Using nanosized drug delivery systems allows to overcome the mechanisms of multidrug resistance of cancer, in this case, chemotherapeutic agents can effectively introduce into cancer cells by endocytosis and accumulate near the nucleus and far from ATP-binding cassette transporters. Creation of boron nitride-based drug delivery nanocarriers with high chemical and oxidative stability is one of the perspective ways. Using chemical vapor deposition spherical boron nitride particles, 100–150 nm in diameter (BNNPs), with peculiar petal-like surfaces or smooth surfaces were fabricated. BNNPs were loaded with doxorubicin.

Drug loading efficacy of BNNPs-DOX was about 0.095 mg/mg of particles. BNNPs-DOX were relatively stable at neutral pH, whereas DOX is effectively released from the BNNPs at acidic pH (pH 4.5–5.5). Using confocal microscopy, the uptake of BNNPs-DOX by IAR-6-1, KB-3-1, K562 cells and multidrug resistant KB-8-5 u IS-9 cells was studied. Most of BNNPs-DOX had been co-localized with LysoTracker, indicating that BNNPs-DOX are located in the endosomes/lysosomes after intracellular delivery.

Key words: boron nitride nanoparticles, boron nitride nanocarriers loaded with doxorubicin, confocal microscopy, endosome/lysosome

Введение

Современные исследования в области разработки высокоэффективных способов лечения онкологических заболеваний включают такое важное направление, как разработка систем доставки противоопухолевых препаратов. Одна из главных проблем лечения онко-

логических заболеваний — множественная лекарственная устойчивость неопластических клеток, возникающая в результате опухолевой прогрессии. Основным механизмом, обеспечивающим невосприимчивость к химиотерапевтическим препаратам клеток с множественной лекарственной устойчивостью, является

гиперэкспрессия в них белков ABC (ATP-binding cassette) семейства мембранных транспортеров, которые обеспечивают выведение препаратов из опухолевых клеток [1, 2].

Применение наночастиц может быть перспективным для преодоления множественной лекарственной устойчивости, так как в этом случае химиопрепараты проникают в опухолевые клетки не диффузией через клеточную мембрану, а посредством эндоцитоза, концентрируясь в околоядерной области вне зоны действия мембранных транспортеров и обеспечивая гибель опухолевой клетки [3, 4]. Известны примеры преодоления множественной лекарственной устойчивости с использованием полимерных и металлических наночастиц, насыщенных доксорубицином [4]. Другим преимуществом использования наночастиц является уменьшение или полное отсутствие токсических эффектов, вызванных воздействием лекарственных препаратов.

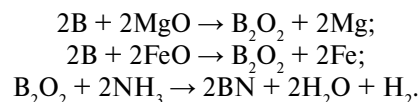
Современные знания о характеристиках различных типов наноматериалов и цитотоксичности наноструктур, конъюгированных с химиопрепаратами, остаются неполными и зачастую противоречивыми. К настоящему времени для транспорта лекарственных препаратов были опробованы различные типы носителей: белки [5], мицеллы [6], липосомы [7] дендримеры [8], неорганические наночастицы [9–14] и др. Одни носители прошли этапы доклинических исследований, другие проходят различные фазы клинических испытаний. На данный момент 5 препаратов на основе липосом утверждены для терапии опухолевых заболеваний [15]. Продолжаются активные попытки получить биосовместимые наночастицы на основе новых материалов с высокой способностью к нагрузке лекарственными препаратами и последующим контролируемым освобождением препарата в опухолевой клетке, индуцированным изменением pH. Для успешного применения в биомедицине нанотранспортеров необходимо изучить их фармакологическую эффективность, а также проконтролировать их возможную цитотоксичность *in vitro* на культурах клеток.

Одним из перспективных материалов для создания наночастиц противоопухолевых препаратов является нитрид бора. Этот материал обладает химической инертностью и высокой стойкостью к окислению [16]. Показана возможность получения наноструктур нитрида бора с различной морфологией: нанотрубки [16–18], нановолокна [19, 20], нанопластины (графеноподобные структуры) [21], наносферы [22]. Кроме того, недавние исследования показали, что наноструктуры нитрида бора не токсичны [23, 24], что позволяет их использовать в медицине.

Цель работы — обработка условий получения наноконъюгатов на основе нитрида бора, нагруженных химиотерапевтическим препаратом доксорубицином, и изучение их взаимодействия с трансформированными клетками.

Материалы и методы

Объект исследования. Наночастицы гексагонального нитрида бора размером 100–150 нм были получены методом химического осаждения из газовой фазы (I. V. Sukhorukova и соавт. [25]). Для получения газообразного оксида бора использовали смесь FeO: MgO:B = 150:28:75 при температуре +1310 °C. Процесс высокотемпературного химического синтеза наноструктур нитрида бора из газовой фазы описан С. Tang и соавт. [26] и предполагает следующую последовательность химических реакций:



Морфология поверхности наночастиц нитрида бора зависела от скоростей подачи транспортного (Ar) и реакционного (NH₃) газов. Для синтеза наночастиц с гладкой наружной поверхностью скорости потока для Ar и NH₃ составляли 500 и 100 см³/мин соответственно, а для синтеза наночастиц с развитой наружной поверхностью — 250 и 50 см³/мин.

Для получения устойчивых лизолов индивидуальных наночастиц нитрида бора использовали метод ультразвукового диспергирования на установке Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия). Для изучения структуры наночастиц применяли просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (JEOL, Япония).

Клеточные линии. Для исследований использовали трансформированные диметилнитрозамином эпителиоциты печени крысы линии IAR-6–1 [27], клетки линии хронического миелоидного лейкоза человека K562 и ее производной — линии IS-9 с множественной лекарственной устойчивостью, индуцированной в результате стабильной трансфекции белка Р-гликопротеина [28], клетки линии карциномы человека KB-3–1 и ее производной — линии KB-8–5 с устойчивостью к доксорубицину, полученной в результате селекции [29].

Получение наноконъюгатов частиц нитрида бора с доксорубицином. Доксорубин разводили до концентрации 0,5 мг/мл или 2,5 мг/мл в NaAc-буферах с разным уровнем pH (5,4; 7,4; 8,4; 9,4) или в дистиллированной воде (H₂O). Наночастицы центрифугировали и к осадкам добавляли раствор доксорубина (1 мл раствора на 2 мг частиц), затем инкубировали 24 ч при температуре +37 °C на качалке. Нагруженные доксорубицином наночастицы центрифугировали 15 мин при скорости 13 400 об/мин. Осадки нагруженных доксорубицином наночастиц ресуспендировали в H₂O и центрифугировали в течение 15 мин при скорости 13 400 об/мин, такую отмывку повторяли 3–5 раз.

Экстракция доксорубина из наноконъюгатов. Доксорубин экстрагировали из отмывых наноконъюгатов с помощью DMSO или 0,1 моль NaAc-буфера (pH 4,0) 24 ч при температуре +37 °C. После этого наночастицы центрифугировали 15 мин при скорости

13 400 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в эпепдорфы и измеряли оптическую плотность (optical density, OD) при длине волны 488 нм.

MTT-тест. Клетки рассеивали в концентрации 20 000 клеток/мл в 24-луночные плашки по 1,9 мл в лунку или в 96-луночные плашки по 200 мкл в лунку в культуральной среде с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой. На следующий день добавляли раствор доксорубина для получения конечных концентраций 25, 50, 100, 250 и 500 нг/мл, а также 1, 5 и 10 мкг/мл. Через 72 ч среду заменяли на 200 мкл среды без сыворотки, добавляли 20 мкл готового раствора MTT (5 мг/мл в фосфатном буфере) и инкубировали 4 ч при температуре +37 °С. Затем среду удаляли, образовавшийся нерастворимый формазан экстрагировали добавлением 150 мкл демитилсульфоксида и ресуспендировали. Измерения OD проводили при длине волны 570 нм. Результаты теста MTT оценивали путем сопоставления OD в опытных и контрольных образцах и рассчитывали долю выживших клеток. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию препарата, вызывающую гибель 50 % клеток IC_{50} .

Микроскопия. Этапы взаимодействия наночастиц с живыми и фиксированными клетками анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия) и инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оборудованного дифференциальной интерференционно-контрастной оптикой и камерой высокого разрешения ORCA-ER (Hamamatsu, Япония).

Флуоресцентно-микроскопический анализ накопления доксорубина в клетках. Клетки рассеивали в концентрации 100 тыс. клеток на чашку со стеклянным дном, через 24 ч меняли среду на бесцветную DMEM/F-12 с HEPES и 10 % телячьей эмбриональной сывороткой. В чашки добавляли доксорубин до конечной концентрации 5 мкг/мл. С помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) выполняли съемку 10 полей зрения для каждой линии в флуоресцентном канале с одинаковой выдержкой (временные точки 0, 15, 75, 120, 180, 240, 300, 360 мин и 24 ч). Обработку изображений проводили в программе ImageJA 1.45b с измерением параметра MGv (Mean Gray Value) для фона, свободного от клеток, цитоплазмы (ЦП) и ядра на флуоресцентном изображении по 2 точки на каждый кадр. Показатель интенсивности флуоресценции (ИФ) вычисляли по формуле:

$$ИФ_{\text{ядро/ЦП}} = (MGV_{\text{ядро/ЦП}} - MGV_{\text{фон}}) / MGV_{\text{фон}}.$$

Трансфекция. Временную трансфекцию клеток KB-8—5 конструкцией EGFP (Evrogen, Россия) выполняли с помощью Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen, Life Technologies, США).

Визуализация эндосом/лизосом в клетках. Прижизненное окрашивание эндосом/лизосом проводили не-

посредственно перед началом наблюдения с использованием LysoTracker Green (Molecular Probes, Life Technologies, США).

Обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы MS Excel, графики и диаграммы были построены с использованием программы GraphPad Prism 6 Version 6.07 (GraphPad Software).

Результаты и обсуждение

Наночастицы гексагонального нитрида бора. При разработке систем для доставки лекарств на основе наночастиц критическими параметрами являются их форма и размер. Полученный нами размер наночастиц лекарственных препаратов составлял 100–150 нм и был оптимальным (рис. 1).

При отработке методов получения наночастиц необходимо принимать в расчет несколько факторов:

1) размер наночастиц должен быть меньше диаметра тончайших капилляров, в которых будет осуществляться их циркуляция;

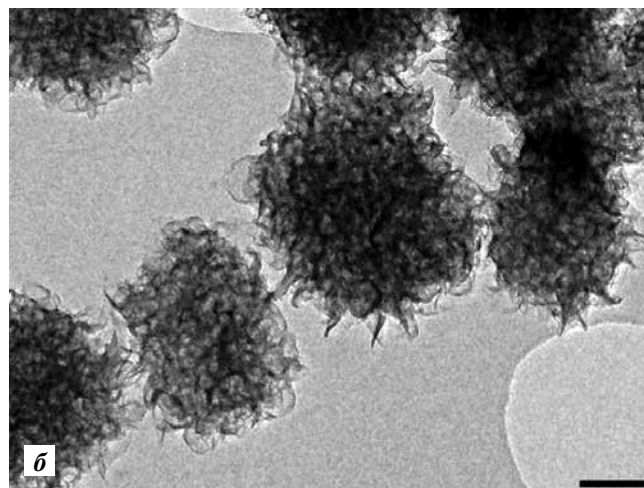
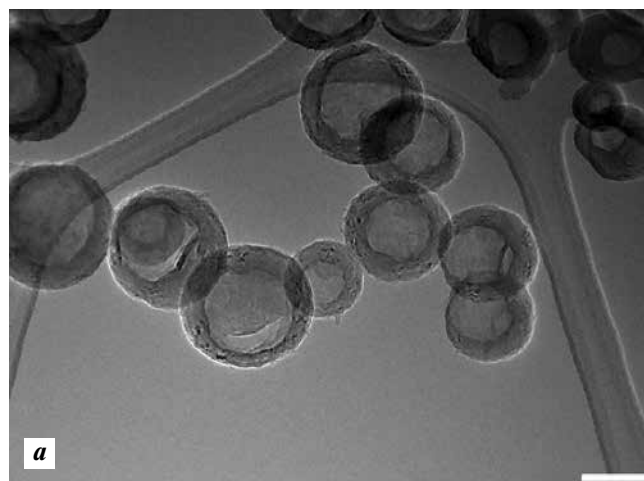


Рис. 1. Типы наночастиц (шкала 100 нм): а — наночастицы нитрида бора с гладкой поверхностью; б — наночастицы нитрида бора с развитой поверхностью

Концентрация доксорубина в растворах после нагрузки наночастиц

Концентрация нагрузочного раствора доксорубина, мг/мл	pH нагрузочного буфера 0,1 М NaAc	Концентрация доксорубина в растворе после нагрузки, мг/мл
0,5	7,4	$0,056 \pm 0,004$
	8,4	$0,028 \pm 0,001$
	9,4	$0,0005 \pm 0,0004$
2,5	7,4	$0,642 \pm 0,006$
	8,4	$0,609 \pm 0,022$
	9,4	$0,458 \pm 0,113$

2) наночастицы должны иметь форму и размер, способствующие их проникновению в опухолевые клетки;

3) размер наночастиц должен препятствовать их быстрому выведению ретикулоэндотелиальной системой;

4) частицы размером < 50 нм лучше поглощаются клетками, однако они и быстрее выводятся из клетки;

5) частицы размером < 100 нм могут покидать кровеносные сосуды через «окна» в эндотелиальной выстилке;

6) частицы размером около 100 нм дольше удерживаются внутри опухолевых клеток.

7) наночастицы размером > 200 нм накапливаются в печени, почках, селезенке;

8) для частиц размером > 500 нм выше вероятность поглощения макрофагами, что препятствует доставке лекарств в опухолевые клетки.

Таким образом, оптимальный размер наночастиц лекарственных препаратов составляет 100–150 нм [30–31]. Форма наночастиц должна быть сферической для лучшего поглощения опухолевыми клетками.

Условия для получения наноконъюгатов частиц нитрида бора с доксорубином. Для сравнения эффек-

тивности нагрузки наночастиц доксорубином в различных концентрациях и при различном уровне pH использовали растворы с концентрацией доксорубина 0,5 и 2,5 мг/мл. Наночастицы перед отмывкой от нагрузочных растворов центрифугировали 15 мин при скорости 13 400 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в эппендорфы и проводили спектрофотометрические измерения OD доксорубина, оставшегося в растворе, при длине волны 488 нм (см. таблицу). Результаты исследования показали, что 0,5 мг/мл — оптимальная концентрация раствора доксорубина для нагрузки наночастиц, так как после нагрузки в растворе практически не остается свободного доксорубина. Использование раствора доксорубина в концентрации 2,5 мг/мл не увеличивало аккумуляцию доксорубина на частицах (данные не представлены), поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 0,5 мг/мл.

Анализ растворов доксорубина после нагрузки наночастиц химиопрепаратом показал, что в растворах с высоким уровнем pH остается меньше свободного доксорубина, что свидетельствует о более эффективной нагрузке наночастиц препаратом при повышении уровня pH (см. таблицу, рис. 2а). Измерения концент-

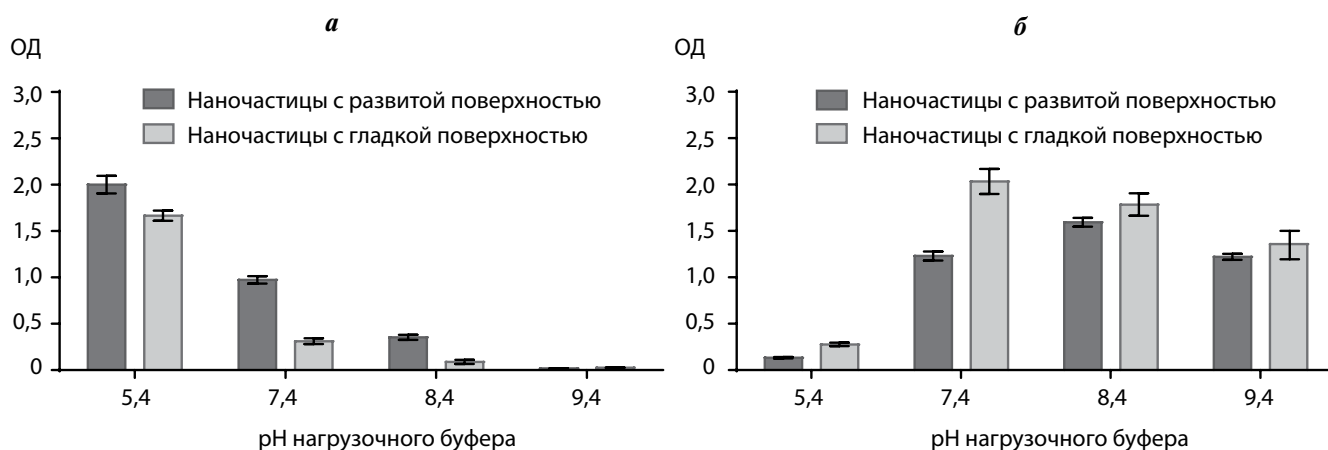


Рис. 2. Эффективность нагрузки наночастиц нитрида бора при различных уровнях pH раствора доксорубина: а — оставшийся в растворе доксорубин (чем выше уровень pH раствора, тем меньше свободного доксорубина остается в растворе после 24 ч инкубации с наночастицами); б — экстрагированный доксорубин (из частиц, нагруженных в кислой среде, экстрагируется значительно меньше доксорубина, чем из частиц, нагруженных в нейтральной и щелочной среде)

рации доксорубина после экстракции наноконъюгатов в демитилсульфоксиде показали, что большее количество доксорубина выходит из наноконъюгатов, полученных в слабощелочных растворах доксорубина (рис. 2б). В дальнейших экспериментах были использованы наноконъюгаты нитрида бора с доксорубином, полученные нагрузкой химиопрепарата в 0,1 М NaAc (pH 8,4).

Спектрофотометрические измерения количества нагруженного на частицы доксорубина после экстракции демитилсульфоксида в раствор показали, что с гладких частиц экстрагировалось около 95 мкг/мг частиц, а с частиц с развитой поверхностью — около 85 мкг/мг частиц, что свидетельствует о высоком уровне нагрузки наноконъюгатов химиопрепаратом.

Условия выхода доксорубина из наноконъюгатов.

В серии экспериментов был проведен анализ выхода доксорубина из наноконъюгатов в NaAc-буферах с различным уровнем pH. Как видно из рис. 3, доксорубин наиболее эффективно выходит из наноконъюгатов в кислой среде (pH 4,5–5,5). Уже за 2 ч в среде с уровнем pH 4,4 доксорубина из наноконъюгатов выходит в 3,5 раза больше, чем при pH 7,4. Известно, что клетки эндосомы и лизосомы имеют кислый pH, поэтому описанные особенности высвобождения доксорубина из наноконъюгатов могут повысить эффективность действия препарата, доставляемого с помощью наночастиц нитрида бора.

Тестирование клеточных систем. Сравнительные исследования цитотоксического эффекта свободного доксорубина проводили с помощью теста на выживаемость клеток (MTT-тест) (рис. 4). При анализе результатов были выявлены выраженные различия исследуемых линий в чувствительности к доксорубину. Для линии K562 IC_{50} составляла $0,10 \pm 0,04$ мкг/мл, для линии IS-9 — $2,5 \pm 1,19$ мкг/мл (разница в 24 раза). Для линии KB-3-1 IC_{50} была равна $0,1 \pm 0,002$ мкг/мл, для линии KB-8-5 — $1,8 \pm 1,2$ мкг/мл (разница в 18 раз).

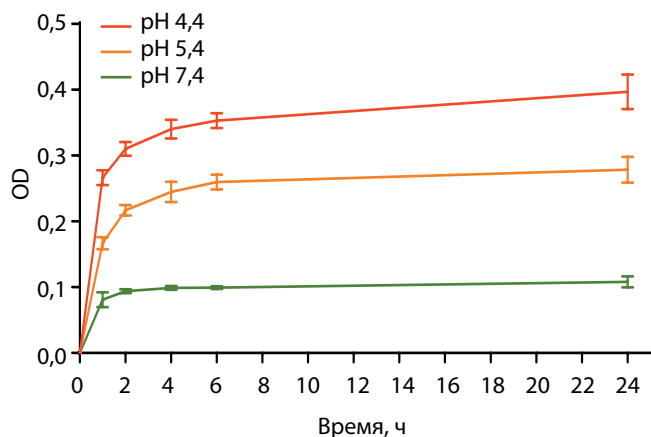


Рис. 3. pH-зависимое высвобождение доксорубина из наноконъюгатов. Измерение OD доксорубина в растворах на протяжении 24 ч исследования

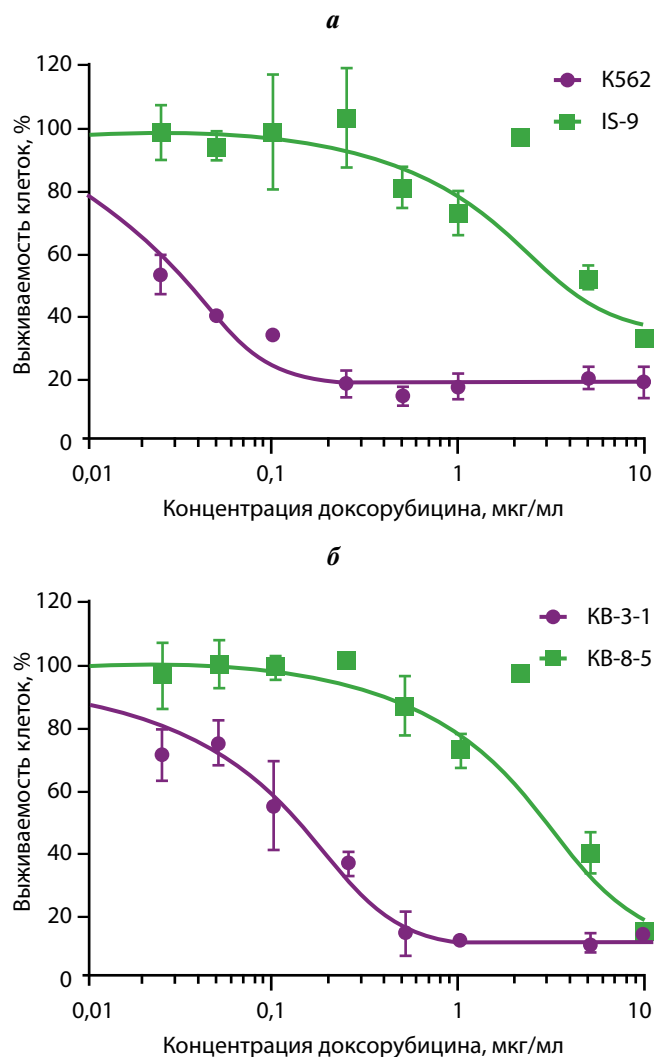


Рис. 4. Выживаемость клеток после воздействия различных концентраций доксорубина (MTT-тест): а — клетки линий K562 и IS-9; б — клетки линий KB-3-1 и KB-8-5

Флуоресцентно-микроскопический анализ накопления доксорубина в клетках. С помощью флуоресцентной микроскопии были проанализированы закономерности накопления свободного доксорубина в чувствительных KB-3-1 и резистентных KB-8-5 клетках (рис. 5). Проведенный анализ показал существенную разницу в накоплении доксорубина в клеточных компартментах. В чувствительных клетках KB-3-1 доксорубин прогрессивно аккумулируется в основном в клеточном ядре, через 24 ч его концентрация в ядре в 2,5 раза больше, чем в ЦП. В резистентных клетках KB-8-5 доксорубин накапливается гораздо слабее, при этом уже через 5 ч его накопление в ядре выходит на плато, а через 24 ч флуоресценция доксорубина в ЦП в 1,5 раза выше, чем в ядре (см. рис. 5б).

Визуализация наноконъюгатов в неопластических клетках. С использованием конфокальной микроскопии было исследовано взаимодействие нагруженных доксорубином наночастиц нитрида бора с трансформированными клетками. Как видно на рис. 6, нано-

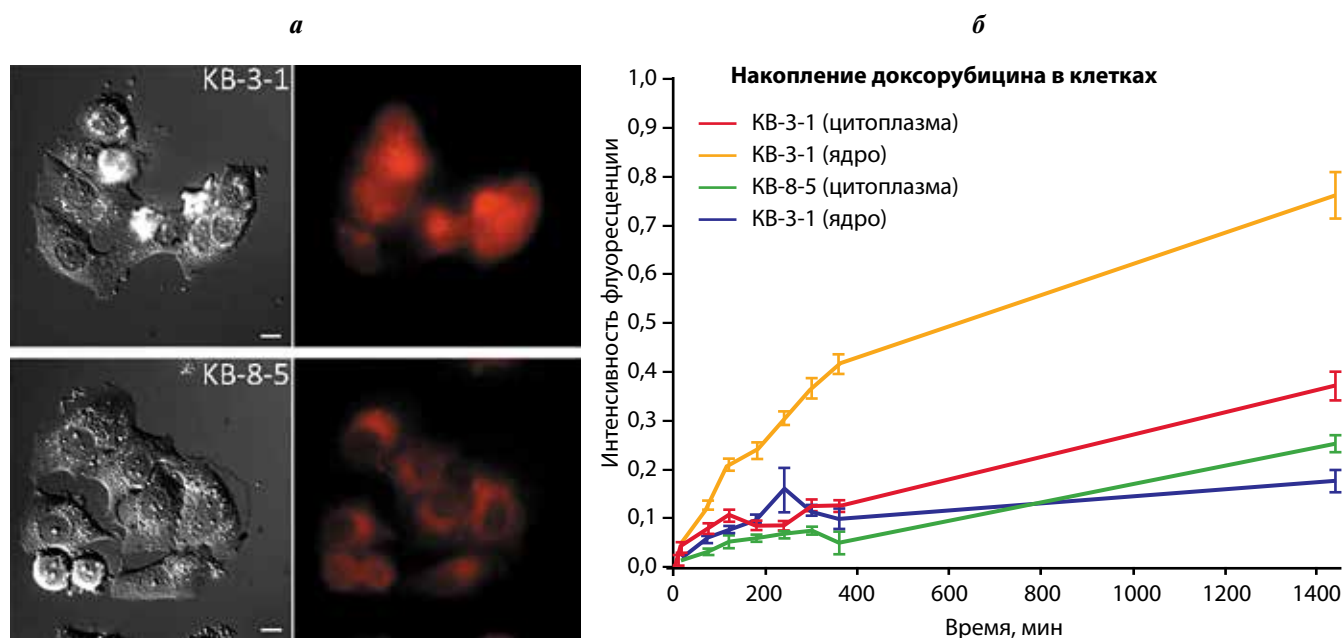


Рис. 5. Различия в накоплении доксорубина в клетках KB-3-1 и KB-8-5: а — клетки KB-3-1 и KB-8-5 после 24 ч инкубации в среде, содержащей 5 мкг/мл доксорубина (DIC (слева) и флуоресцентная микроскопия (справа); шкала 10 мкм); б — динамика накопления доксорубина в цитоплазме и в ядре клеток KB-3-1 и KB-8-5 при инкубации в среде, содержащей 5 мкг/мл доксорубина

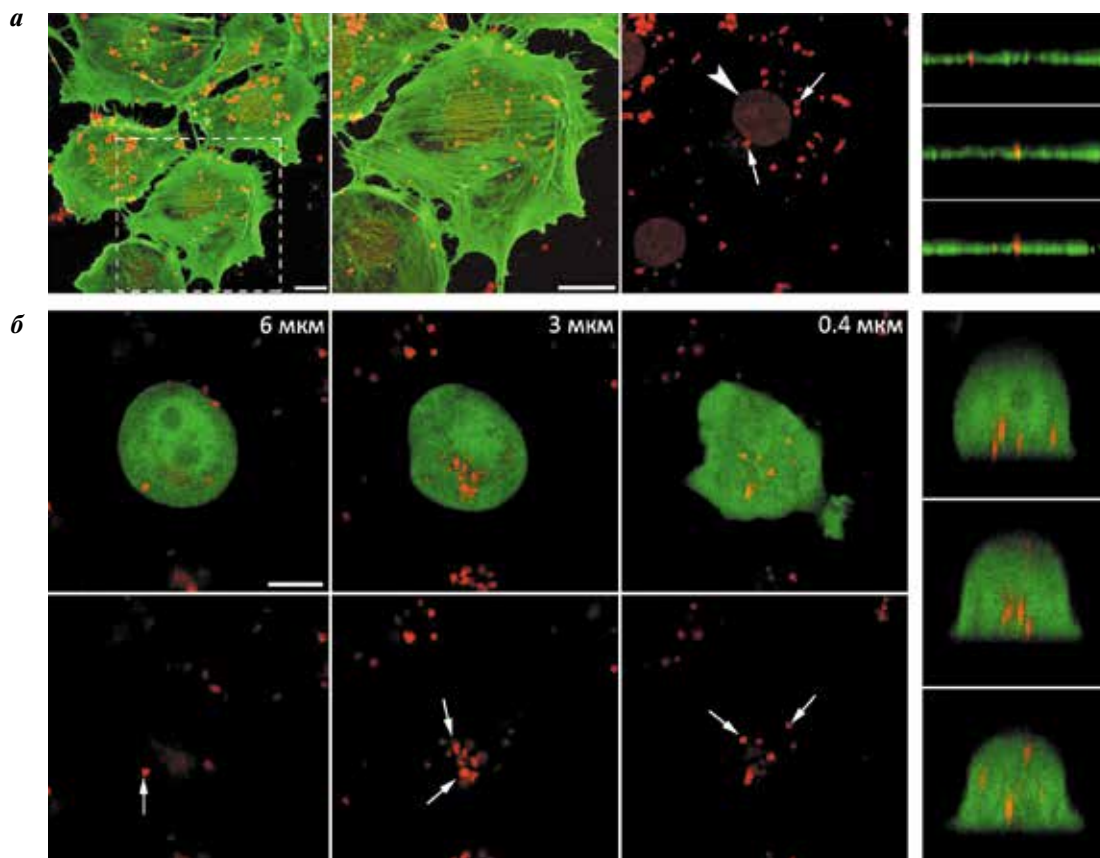


Рис. 6. Наночастицы нитрида бора, нагруженные доксорубином, в неопластических клетках (конфокальная микроскопия; шкала 10 мкм): а — трансформированные эпителиальные клетки IAR-6-1 после 7 ч инкубации с наноконъюгатами (актиновый цитоскелет, окрашивание Alexa488-phalloidin (зеленый), флуоресценция доксорубина (красный); левая часть — проекция хуэ, правая часть — проекция хзу; стрелки — нагруженные доксорубином частицы нитрида бора; флажок — заметна флуоресценция доксорубина в ядре); б — клетки KB-8-5 после 24 ч инкубации с нагруженными доксорубином наночастицами нитрида бора (для визуализации клетки были трансфицированы GFP; зеленый — GFP, красный — флуоресценция доксорубина; левая часть — проекции хуэ с указанием расстояния до подложки, правая часть — проекции хзу; стрелки — нагруженные доксорубином частицы нитрида бора

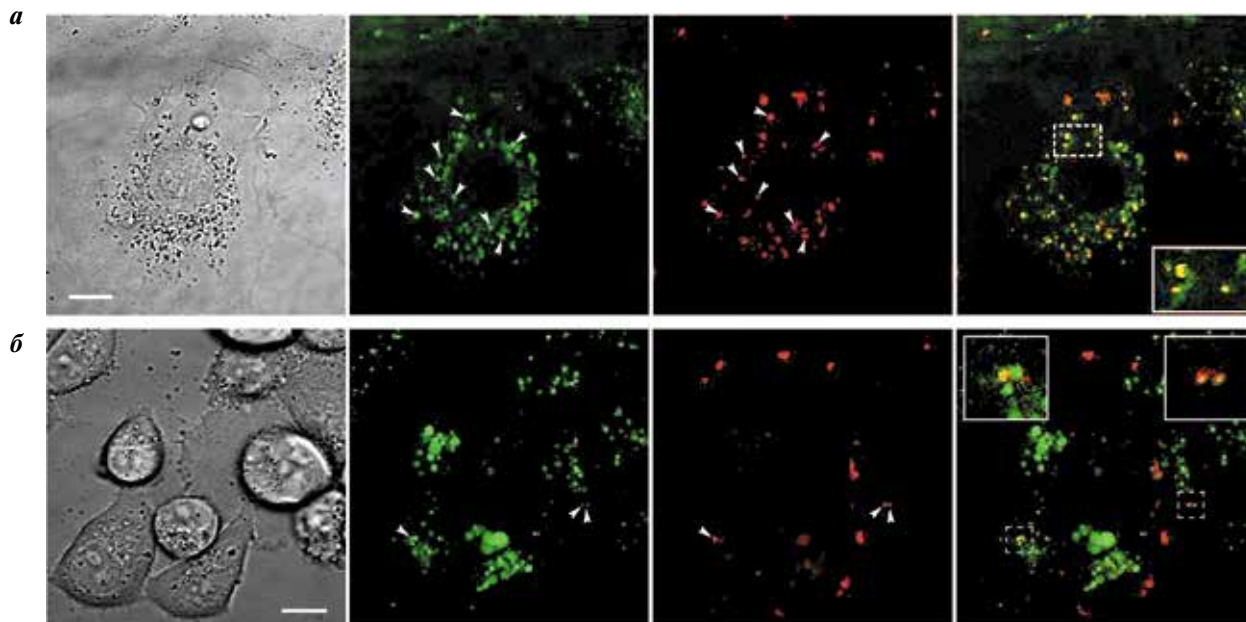


Рис. 7. Выявление наноконъюгатов в эндосомальном/лизосомальном компартменте неопластических клеток (флажки — колокализация доксорубицина с лизосомами; во врезках увеличенные фрагменты изображения; конфокальная микроскопия; шкала 10 мкм): а — трансформированные эпителиальные клетки IAR-6—1 после 4 ч инкубации с наноконъюгатами; б — клетки KB-8—5 после 2,5 ч инкубации с наноконъюгатами (слева направо: DIC-микроскопия; лизосомы, окрашенные LysoTracker Green (зеленый); флуоресценция доксорубицина (красный); наложение каналов)

конъюгаты успешно проникают внутрь клеток и концентрируются около ядра. В чувствительных клетках (см. рис. 6а) также видно, что доксорубицин с частиц аккумулируется в ядре.

Для прояснения механизмов проникновения нагруженных доксорубицином частиц нитрида бора в клетки был проведен сравнительный анализ распределения наноконъюгатов и эндосом/лизосом, окрашенных с помощью специфического красителя LysoTracker Green. По данным конфокальной микроскопии как в чувствительных, так и в резистентных клетках наблюдается колокализация наноконъюгатов и эндосом/лизосом (рис. 7). Ранее мы также показали, что ингибитор динаминопосредованного эндоцитоза динасор угнетает накопление доксорубицина в клетках, инкубированных с частицами нитрида бора, нагруженными доксорубицином [25]. Полученные данные указывают на то, что наноконъюгаты нитрида бора с доксорубицином высвобождают химиопрепарат вне зоны мембранных транспортеров и поэтому могут рассматриваться в плане их возможного применения для преодоления механизмов множественной лекарственной устойчивости.

Заключение

Наночастицы гексагонального нитрида бора размером 100–150 нм, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, были использованы для получения наноконъюгатов с высоким уровнем нагрузки доксорубицина. Наночастицы нитрида бора, нагруженные доксорубицином, стабильны при нейтральном уровне pH, но эффективно высвобождают химиопрепарат в среде с уровнем pH 4,5–5,5. Проведенные исследования показали, что трансформированные клетки, как чувствительные, так и резистентные к доксорубицину, способны активно эндоцитировать наноконъюгаты, высвобождая доксорубицин в ЦП. Эксперименты по исследованию действия наноконъюгатов частиц нитрида бора с доксорубицином на чувствительные и резистентные к химиопрепаратам клетки будут продолжены.

Благодарим К.Л. Фаерштейна (НИТУ «МИСЦ») за помощь в проведении просвечивающей электронной микроскопии и Е.Ю. Рыбалкину (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина») за предоставленные культуры клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kirtane A.R., Kalscheuer S.M., Panyama J. Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(13–14): 1731–47.
2. Amin M.L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights* 2013;7:27–34.
3. Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(17):2873–96.
4. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(1):21–3.
5. Torchilin V.P., Lukyanov A.N. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges

- and solutions. *Drug Discov Today* 2003;8(6):259–66.
6. Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res* 2010;27(12):2569–89.
 7. Kaasgaard T., Andresen T.L. Liposomal cancer therapy: exploiting tumor characteristics. *expert opin drug deliv* 2010;7(2):225–43.
 8. Mintzer M.A., Grinstaff M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem Soc Rev* 2011;40(1):173–90.
 9. Dreaden E.C., Mackey M.A., Huang X. et al. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem Soc Rev* 2011;40(7):3391–404.
 10. Lal S., Clare S.E., Halas N.J. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Acc Chem Res* 2008;41(12):1842–51.
 11. Jokerst J.V., Gambhir S.S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. *Acc Chem Res* 2011;44(10):1050–60.
 12. Trewyn B.G., Slowing I.I., Giri S. et al. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release. *Acc Chem Res* 2007;40(9):846–53.
 13. Bonacchi S., Genovese D., Juris R. et al. Luminescent silica nanoparticles. extending the frontiers of brightness. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50(18):4056–66.
 14. Xie J., Huang J., Li X. et al. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr Med Chem* 2009;16(10):1278–94.
 15. Torchilin V.P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(11):813–27.
 16. Hurst J. Chapter 9 – Boron nitride nanotubes, silicon carbide nanotubes, and carbon nanotubes – a comparison of properties and applications. In: *Nanotube Superfiber Materials*. Elsevier, 2014. Pp. 267–287.
 17. Ciofani G., Del Turco S., Genchi G.G. et al. Transferrin-conjugated boron nitride nanotubes: Protein grafting, characterization, and interaction with human endothelial cells. *Int J Pharm* 2012;436(1–2):444–53.
 18. Ferreira T.H., Marino A., Rocca A. et al. Folate-grafted boron nitride nanotubes: possible exploitation in cancer therapy. *Int J Pharm* 2015;481(1–2): 56–63.
 19. Li X., Wen G., Zhang T. et al. Synthesis of continuous boron nitride nanofibers by electrospinning. *Physics Procedia* 2012;25:185–8.
 20. Lin L.X., Zheng Y., Li Z.-H. et al. A simple method to synthesize polyhedral hexagonal boron nitride nanofibers. *Solid State Sci* 2007;9:1099–104.
 21. Lacerda L., Raffa V., Prato M. et al. Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics. *Nano Today* 2007;2:38–43.
 22. Yamakov V., Park C., Kang J.H. et al. Piezoelectric molecular dynamics model for boron nitride nanotubes. *Computat Mater Sci* 2014;95:362–70.
 23. Ciofani G., Danti S., Genchi G.G. et al. Boron nitride nanotubes: biocompatibility and potential spill-over in nanomedicine. *Small* 2013;9(9–10):1672–85.
 24. Salvetti A., Rossi L., Iacopetti P. et al. *In vivo* biocompatibility of boron nitride nanotubes: effects on stem cell biology and tissue regeneration in planarians. *Nanomedicine* 2015;10(12):1911–22.
 25. Sukhorukova I.V., Zhitnyak I.Y., Kovalskii A.M. et al. Boron nitride nanoparticles with petal-like surface as anticancer drug delivery system. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7(31):17217–25.
 26. Tang C., Bando Y., Sato T., Kurashima K. A novel precursor for synthesis of pure boron nitride nanotubes. *Chem Commun* 2002;12:1290–1.
 27. Bannikov G.A., Guelstein V.I., Montesano R. et al. Cell shape and organization of cytoskeleton and surface fibronectin in non-tumorigenic rat liver cultures. *J Cell Sci* 1982;54:47–67.
 28. Park S.W., Lomri N., Simeoni L.A. et al. Analysis of P-glycoprotein-mediated membrane transport in human peripheral blood lymphocytes using the uic2 shift assay. *Cytometry A* 2003;53(2):67–78.
 29. Richert N., Akiyama S., Shen D. et al. Multiply drug-resistant human KB carcinoma cells have decreased amounts of a 75-kDa and a 72-kDa glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(8): 2330–3.
 30. Dreher M.R., Liu W., Michelich C.R. et al. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:335–44.
 31. Champion J.A., Katare Y.K., Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Control Release* 2007;121(1–2):3–9.

Высокочувствительное сканирование генных мутаций: зонды TaqMan как блокирующие агенты

И.В. Ботезату¹, И.О. Панчук¹, А.М. Строганова², А.И. Сендерович², В.Н. Кондратова¹,
В.П. Шелепов¹, А.В. Лихтенштейн¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Метод плавления ДНК весьма эффективен в клинической генодиагностике, прост в исполнении, производителен, экономичен и, кроме того, реализуется в «закрытом формате», сводящем к минимуму затраты времени, труда и риск перекрестного загрязнения образцов. Данный метод более чувствительный, чем секвенирование по Сэнгеру (предел обнаружения мутантных аллелей ~5 и ~15 % соответственно), однако уступает в этом отношении другим, более трудоемким и дорогим методам (в частности, капельной цифровой полимеразной цепной реакции (digital droplet PCR)). На гене BRAF (как прототипе) мы разработали оригинальный вариант метода плавления ДНК, основанный на способности зондов TaqMan затруднять движение Taq-полимеразы по матрице. Установлено, что эффект блокирования слабее выражен на мутантной матрице из-за присутствия в дуплексе зонд-ДНК неспаренного основания. Предложен протокол полимеразной цепной реакции, дискриминирующий амплификацию мутантных и нормальных аллелей и обеспечивающий существенное (10-кратное и более) повышение чувствительности мутационного сканирования.

Ключевые слова: сканирование мутаций, плавление ДНК, зонд TaqMan, ген BRAF

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-42–49

Highly sensitive scanning of gene mutations: TaqMan probes as blocking agents

I. V. Botezatu¹, I. O. Panchuk¹, A. M. Stroganova², A. I. Senderovich², V. N. Kondratova¹, V. P. Shelepov¹, A. V. Lichtenshtein¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Research Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

DNA Melting Analysis is very effective in clinical DNA diagnostics: it is simple to perform, high throughput, labor-, time- and cost-effective and is implemented in the “closed tube” format minimizing the risk of samples cross-contamination. Although more sensitive than sequencing by Sanger (mutant allele detection limit is ~5 and ~15 % respectively), it, however, is inferior in this respect to some other, more laborious and expensive methods (in particular, ddPCR (digital droplet PCR)). Using the BRAF gene as a prototype, we developed the original version of the DNA melting analysis, based on the ability of TaqMan probes to hamper the primer extension reaction by Taq-polymerase. It is found that the weaker blocking effect on the mutant template, which is due to the mismatch in the probe-DNA heteroduplex, permits enriched amplification of the mutant allele and provides a significant (10-fold or more) increase in sensitivity of mutation scanning.

Key words: mutation scanning, DNA melting analysis, TaqMan probe, BRAF gene

Введение

Идентификация генных мутаций в ДНК опухоли — важный этап исследования онкологического больного. По мере увеличения числа опухолей с секвенированным геномом роль клинической генодиагностики постоянно растет. В фундаментальных исследованиях определяются присущие конкретному типу опухоли драйверные мутации (например, мутации *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в меланоме, раке толстой кишки и легких) [1, 2]. Их обнаружение в клинических образцах облегчает дифференциальную диагностику и прогноз заболевания, определяет выбор терапии [3, 4].

Генодиагностика рака сталкивается с рядом трудностей. Во-первых, клон мутантных клеток, обуславливающих лекарственную устойчивость опухоли, зачастую крайне мал и его трудно выявить [5, 6]. Во-вторых, одиночный биоптат опухоли не дает полного представления о ее клональной гетерогенности и наборе драйверных мутаций [7]. В-третьих, после удаления основного очага, когда стандартная биопсия исключена, обеспечить мониторинг опухолевого роста (для оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидива) может лишь жидкостная биопсия, т. е. анализ ДНК плазмы крови, обычно сильно фрагментированной.

ванной и с крайне низким содержанием мутантных аллелей [8].

Возможность преодоления этих трудностей определяется чувствительностью используемых методов анализа. У метода секвенирования по Сэнгеру («золотой стандарт» генотипирования в клинике) она невелика (предел обнаружения мутантных аллелей ~15 %), что обуславливает высокий уровень ложноотрицательных результатов (в частности, в случае *KRAS* это ведет к неадекватному и чреватому негативными последствиями назначению таргетной терапии). Поэтому важной задачей является внедрение в клиническую практику новых способов мутационного сканирования, более чувствительных, чем существующие, и в то же время простых, экономичных и производительных. В наибольшей степени удовлетворяет этим условиям недавно появившийся метод — анализ плавления ДНК (DNA Melting Analysis, DMA) с зондами TaqMan [9–11] (ранее они использовались исключительно для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (РВ) [12]).

В данной работе установлено, что зонды TaqMan, в дополнение к двум уже известным их функциям (мониторинг ПЦР-РВ и плавление ДНК), могут служить блокирующими агентами, избирательно подавляющими амплификацию аллелей «дикого» типа. Разработанный нами протокол асимметричной ПЦР-РВ, использующий это свойство зондов TaqMan, обеспечивает существенное (более чем 10-кратное) повышение чувствительности мутационного сканирования «горячих участков» генома, в частности гена *BRAF*, использованного в качестве прототипа.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Образцы опухолевой ткани (рак легкого и толстой кишки, меланома) получали в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки карциномы толстой кишки RKO (ATCC® CRL 2577™) с гетерозиготной мутацией V600E (T1799A) были предоставлены В.В. Татарским (НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Смеси мутантного и «дикого» аллелей получали смешиванием ДНК «дикого» типа и клеток RKO.

ДНК клеток опухолевой ткани выделяли депротеинизацией фенолом и хлороформом, а из ткани, заключенной в парафиновые блоки, — с использованием коммерческого набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически (Nano-Drop 1000, Thermo Scientific).

Секвенирование обеих нитей ампликона осуществляли методом Сэнгера (Синтол, Россия).

Термодинамические расчеты температуры плавления ДНК (T_m), праймеров и зондов проводили с помощью программы MeltCalc [13].

Асимметричная ПЦР-РВ и плавление ампликонов. На рис. 1 представлены последовательные этапы DMA:

- 1) асимметричная ПЦР-РВ, в результате которой в инкубационной среде оказываются как двунитевые, так и одностебчатые ампликоны (только с последними могут гибридизоваться зонды TaqMan);
- 2) плавление гибридов, сопровождающееся падением флуоресценции;
- 3) построение пиков плавления (отрицательной производной изменений флуоресценции по темпера-

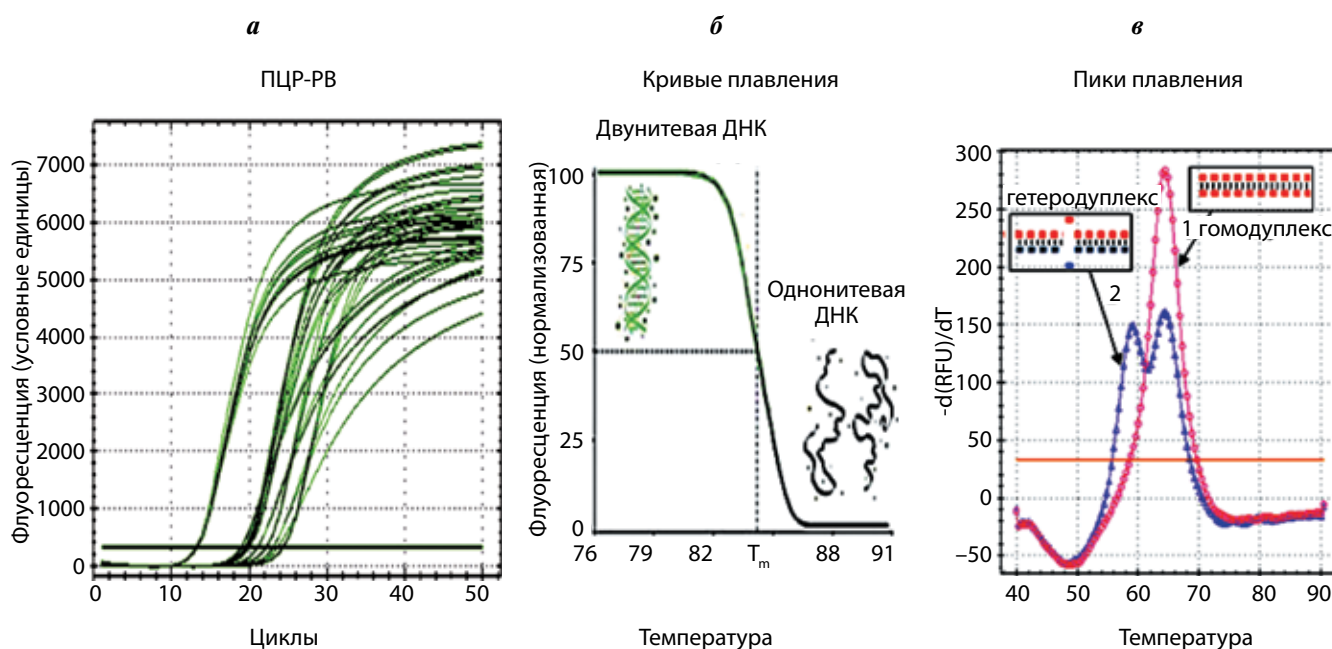


Рис. 1. Последовательные этапы DMA: а — асимметричная ПЦР-РВ с зондами TaqMan (гидролиз зонда во время реакции сопровождается «разгоранием» флуоресценции, что позволяет в реальном времени судить о ходе реакции); б — повышение температуры приводит к фазовому переходу ДНК из двунитевой в одностебчатую форму, что сопровождается падением флуоресценции; в — симметричный пик (гомодуплекс — кривая 1) свидетельствует о присутствии аллеля «дикого» типа, дополнительный пик слева (гетеродуплекс — кривая 2) — о присутствии мутантного аллеля

Размер ампликона гена *BRAF*, последовательности праймеров и зондов TaqMan

Ампликон (экзон, кодоны, длина)	Праймер, зонд*	Последовательность (длина, число пар оснований)
B15 (15, 597–601, 197 пар оснований)	Прямой	5'– gagatctactgttttcttactt (24 b)
	Обратный	5'– ggccaaaaatttaacagtc (19 b)
	Зонд B15-ROX(30)s	5'– ROX-agggtatttggtctagctacagtgaaatc-BHQ2 (30 b)
	Зонд B15-Cy5(26)as	5'– Cy5-accactccatcgagatttcactgta-BHQ2 (26 b)

*В названии зонда TaqMan указаны соответствующий ампликон, флуорофор, длина олигонуклеотида и направление (*sense* или *antisense*).

туре). Основной пик (гомодуплекс) отражает присутствие аллеля «дикого» типа, пик, расположенный левее, в области меньших температур (гетеродуплекс), – присутствие мутантных аллелей.

DMA в стандартных условиях (DMA_{st}) [10, 11]. Размер ампликона гена *BRAF* (Genbank Accession number NC_000007.14), последовательности праймеров и зондов TaqMan представлены в табл. 1. Последовательности праймеров и зондов находили с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., США). Схема ампликона гена *BRAF* с взаимным расположение праймеров, зондов и «горячего участка» с кодоном V600, в котором мутации наиболее часты, представлена на рис. 2. Зонды «сдвинуты» относительно друг друга (перекрывание – 12 пар оснований) для того, чтобы исключить возможность их гибридизации друг с другом, конкурентной по отношению к гибридизации каждого из них с ДНК (во время ПЦР-РВ и плавления).

Асимметричную ПЦР-РВ вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 8,8; 50 мМ KCl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов; прямой и обратный праймеры в соотношении 1:10 или 10:1 (т. е. 0,04 мМ/0,4 мМ или 0,4 мМ/0,04 мМ) в зависимости от необходимости синтезировать анти-смысловую или смысловую нить ампликона соответственно, что позволило сканировать мутации в обеих его нитях; 0,2 мМ соответствующего зонда TaqMan; 1,25 ед. not-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия);

5 мкл раствора ДНК в воде. Условия ПЦР-РВ: начальная денатурация – 5 мин при температуре +95 °С, затем 55 циклов – 13 с при температуре +95 °С, 15 с при +57 °С и 20 с при +72 °С (флуоресценцию регистрировали при температуре +72 °С). По завершении ПЦР продукты реакции прогревали 1 мин при температуре +95 °С, 2 мин при +55 °С, после чего повышали температуру от +55 °С до +85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с).

DMA в модифицированных условиях (DMA_{mod}). Асимметричную ПЦР-РВ вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 8,8; 50 мМ KCl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов; 0,2 x EvaGreen (Biotium, США); 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 1 мМ дитиотреитола; праймеры в соотношении 15:1 или 1:15 (0,4 мМ одного и 0,027 мМ другого) в зависимости от необходимости синтезировать преимущественно смысловую или анти-смысловую нить ампликона; по 0,25 мМ зондов B15-ROX(30)s и B15-Cy5(26)as; 0,63 ед. hot-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия); 5 мкл раствора ДНК в воде. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при температуре +95 °С, затем 80–100 циклов – 13 с при температуре +95 °С, 2 с при +57 °С с регистрацией флуоресценции. По завершении ПЦР продукты реакции прогревали 1 мин при температуре +95 °С, затем 2 мин при +55 °С, после чего повышали температуру от +55 °С до +85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с). Данные анализировали с помощью программы Bio-

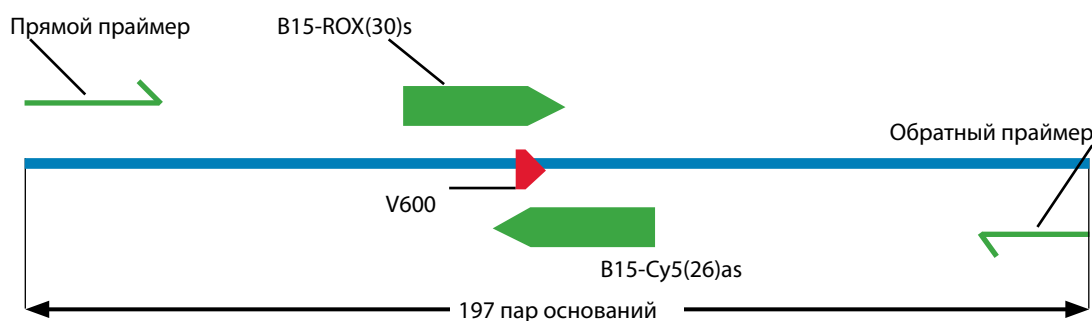


Рис. 2. Схема ампликона B15 (название ампликона происходит от названия гена и номера экзона). Расположение праймеров и зондов TaqMan B15-ROX(30)s и B15-Cy5(26)as показано стрелками (в названии зонда указаны соответствующий ампликон, флуорофор, длина олигонуклеотида и направление – *sense* или *antisense*); V600 – «горячий участок» гена (сайт наиболее часто встречающихся мутаций)

Rad CFX Manager (version 1.6), в ряде случаев экспортировали в Microsoft Excel, пики плавления нормализовывали по отношению к максимальному их значению, принятому за 100 %.

При проведении асимметричной ПЦР-РВ в модифицированных условиях оба зонда функционируют в качестве индикаторов хода реакции и блокирующих агентов, в то время как в DMA участвует только один из них, комплементарный односторонней (избыточной) ДНК.

Результаты

Предложенный недавно вариант DMA [9] позволяет использовать зонды TaqMan не только на этапе ПЦР-РВ, для чего они изначально были предназначены [12], но и на этапе плавления ДНК, что существенно упростило и удешевило метод, повысило его эффективность и расширило возможности применения. DMA с зондами TaqMan реализуется в «закрытом формате», т. е. в одной пробирке без дополнительных процедур (см. рис. 1), что сводит к минимуму затраты времени, труда и риск перекрестного загрязнения образцов.

В нашей предыдущей работе были определены параметры DMA, влияющие на эффективность метода: оптимальное число циклов асимметричной ПЦР-РВ, сочетание флуорофора, гасителя и длины олигонуклеотида TaqMan, нить (смысловая или антисмысловая) для максимального разрешения нормальных и мутантных аллелей, величина температурного сдвига гетеродуплекса относительно гомодуплекса (ΔT_m), указывающая на тип мутации. Усовершенствованный метод был успешно применен в клиническом мутационном сканировании генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *PIK3CA* [10, 11].

При исследовании кинетики ПЦР-РВ возникло предположение, что гидролизующие зонды TaqMan (олигонуклеотиды длиной 25–30 пар оснований с флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце) могут быть использованы также в качестве агентов, блокирующих ПЦР-РВ. В опытах с применением интеркалирующего красителя EvaGreen было обнаружено, что присутствие в инкубационной среде, помимо праймеров, олигонуклеотидов, способных гибридизоваться с матрицей ДНК (таковы зонды TaqMan), приводит к увеличению числа циклов амплификации (C_t) на 0,5–1,5 (здесь не показано). Это могло означать, что устранение Taq-полимеразой возникающего на ее пути препятствия посредством 5'–3'-экзонуклеазной активности сопряжено со снижением скорости полимеризации. Это предположение согласуется с данными о том, что удлинение праймера существенно замедляется, когда фермент «наталкивается» на сгибризованный с матрицей олигонуклеотид [14]. Таким образом, возникает потенциальная возможность преимущественной амплификации мутантных аллелей, поскольку комплекс зонда с мутантной матрицей менее стабилен

(из-за неспаренного основания), чем с матрицей «дикого» типа (имеется в виду, что зонд TaqMan должен подавлять амплификацию нормального аллеля сильнее, чем мутантного). В пользу этого свидетельствуют термодинамические расчеты [13], показывающие, что в избранных нами условиях (длина, последовательность и концентрация зондов TaqMan, равная 0,2–0,3 мкМ) присутствие мутации в «горячем участке» гена *BRAF* снижает величину T_m дуплекса зонд/ДНК на 3–7 °С.

Исходя из предположения, что наибольший блокирующий эффект может быть достигнут в присутствии обоих (смыслового и антисмыслового) зондов TaqMan (поскольку они должны подавлять синтез обеих нитей ампликона), мы исследовали их совместное влияние на амплификацию «дикого» и мутантного аллелей. Объектом исследования служил образец ДНК с содержанием 5 % наиболее часто встречающейся мутации V600E (замена T1799A), который получали смешиванием ДНК нормальных клеток и клеток RKO. В различных условиях проведения асимметричной ПЦР-РВ и плавления ДНК оценивали соотношение пиков плавления гетеродуплекса и гомодуплекса, которые отражают доли мутантного и «дикого» аллелей соответственно. В предварительных экспериментах было установлено, что лучшей их дискриминации способствуют укорочение этапа отжига праймеров и элонгации, а также снижение концентрации Taq-полимеразы. На рис. 3 представлены результаты определения в условиях градиентной асимметричной ПЦР-РВ температуры отжига праймеров и зондов, в максимальной степени «проявляющей» мутантный аллель. Для удобства сравнения на каждом рисунке показано сканирование образца ДНК в стандартных условиях (кривая 1), не позволяющих надежно идентифицировать минорный мутантный аллель, а также в модифицированных условиях (кривая 2). Из результатов следует, что при снижении температуры отжига, т. е. по мере стабилизации дуплексов ДНК и усиления блокирующего эффекта зондов, преимущественный синтез мутантного аллеля становится более выраженным (как следствие, пик гетеродуплекса растет и из минорного, на уровне фона, превращается в доминирующий). Максимальное обогащение (примерно 10-кратное) мутантного аллеля достигается при температуре отжига около +50 °С (более высокая температура препятствует связыванию праймеров, тогда как более низкая полностью блокирует амплификацию). Следует отметить, что в последующих опытах температуру отжига оказалось необходимым существенно корректировать, поскольку условия градиентной ПЦР-РВ позволяют выявить сам эффект «обогащения» мутантного аллеля, но не гарантируют точности определения исследуемого параметра.

На рис. 4 представлены результаты определения чувствительности (предела обнаружения мутантных аллелей гена *BRAF*) 2 способами: DMA_{st} и DMA_{mod}. «Обогащение» мутантного аллеля вследствие его пре-

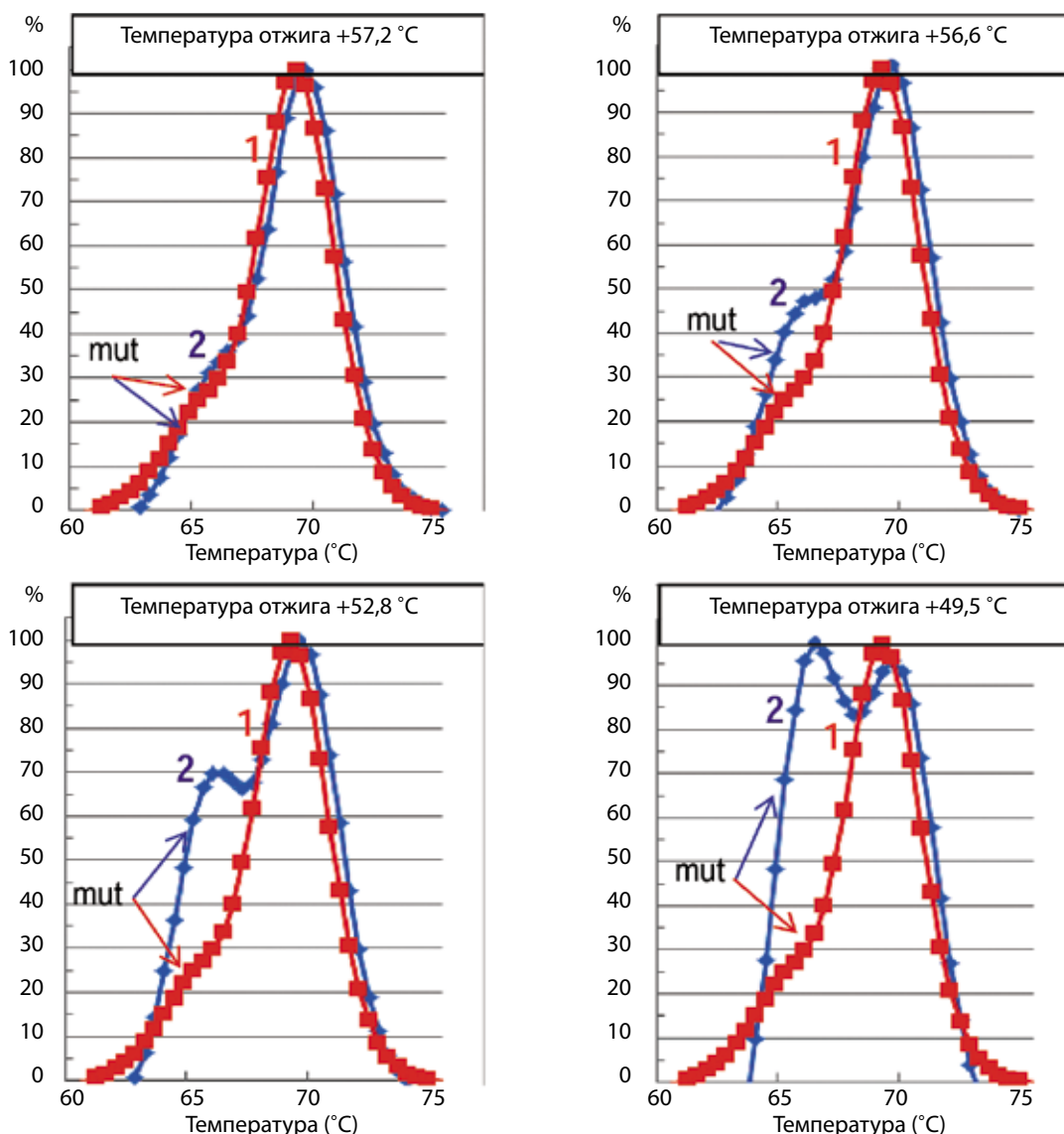


Рис. 3. Градиентная асимметричная ПЦР-РВ с последующим DMA. Образец ДНК с содержанием 5 % мутантного аллеля *BRAF* (V600E) анализировали в стандартных (кривые 1) и в модифицированных (кривые 2) условиях, т. е. с применением во время амплификации блокирующих зондов TaqMan. DMA проводили при отсутствии зондов и добавляли их на этапе плавления ДНК. Данные, полученные с помощью программы Bio-Rad CFX Manager, экспортировали в Microsoft Excel и пики плавления нормализовали по отношению к максимальному их значению, принятому за 100 %. Стрелками указаны позиции гетеродуплексов, отражающих присутствие и содержание мутантного аллеля

имущественной амплификации приводит к значительному (~15-кратному) повышению чувствительности анализа.

Цель следующего этапа — верификация полученных результатов. Обладающая 5'–3'-экзонуклеазной активностью (необходимой для гидролиза зонда TaqMan), но не имеющая «редакторской» (3'–5' экзонуклеазной) активности Taq-полимераза относится к ферментам, допускающим большое число ошибок ($1-5 \times 10^{-5}$ в расчете на пару оснований и 1 цикл удвоения) [15, 16]. Поэтому в ампликонах могут возникать «рассеянные» нуклеотидные замены, число которых в процессе ПЦР растет, формирует мутационный фон и может приводить к неверной интерпретации результатов. По этой причине результаты «обогащения» мутантных аллелей мы проверили секвенированием.

На рис. 5 представлено исследование образца ДНК с содержанием 5 % мутантного аллеля V600E (замена Т на А) гена *BRAF* методами DMA_{st} и DMA_{mod} с последующим секвенированием ампликонов. Видно, что только в последнем случае пики плавления ДНК и секвенирование свидетельствуют о наличии мутации, тогда как стандартный подход не позволяет выявить мутантный аллель, присутствующий в столь низкой (5 %) концентрации. Аналогичный результат был получен при исследовании клинического образца ДНК меланомы, присутствие в котором мутантного аллеля обнаружено только посредством DMA_{mod} (рис. 6).

Заключение

В предлагаемом нами методе условия реакции подбирали таким образом, чтобы обеспечить преимуще-

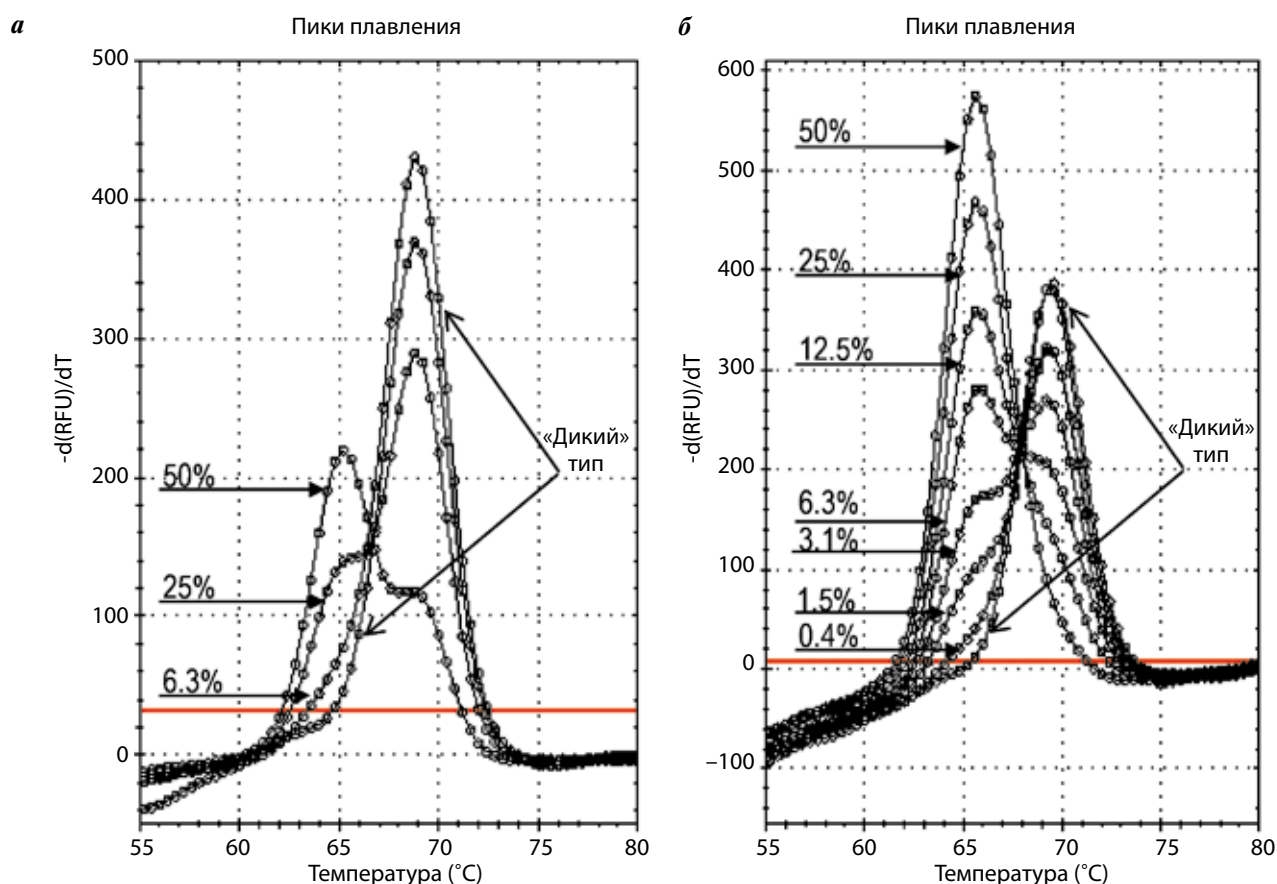


Рис. 4. Сравнение чувствительности определения мутантных аллелей *BRAF* посредством серийного разведения ДНК клеток *RKO* (мутация *V600E*) в ДНК «дикого» типа (пики плавления аллелей «дикого» типа (wt) и мутантных обозначены стрелками (в последнем случае указано также процентное содержание мутантной ДНК); пределы обнаружения мутантного аллеля *V600E* посредством DMA_{st} и DMA_{mod} составляют 6,3 и 0,4 % соответственно): а – DMA_{st} ; б – DMA_{mod}

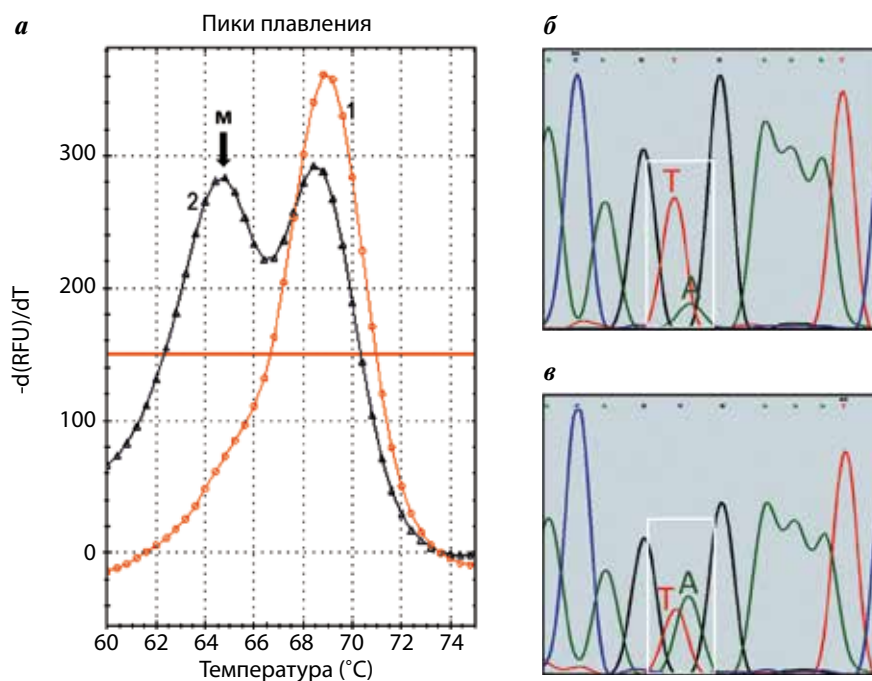


Рис. 5. Верификация секвенированием по Сэнгеру результатов мутационного сканирования: а – образец ДНК с содержанием 5 % мутантного аллеля *T1799A* анализировали DMA_{st} и DMA_{mod} (кривые 1 и 2 соответственно). Гетеродуплекс, свидетельствующий о присутствии мутантного аллеля (м) указан стрелкой; б, в – секвенирование ампликонов DMA_{st} и DMA_{mod} соответственно (мутантный аллель, присутствующий в 1-м случае на уровне фона, во 2-м случае становится доминирующим)

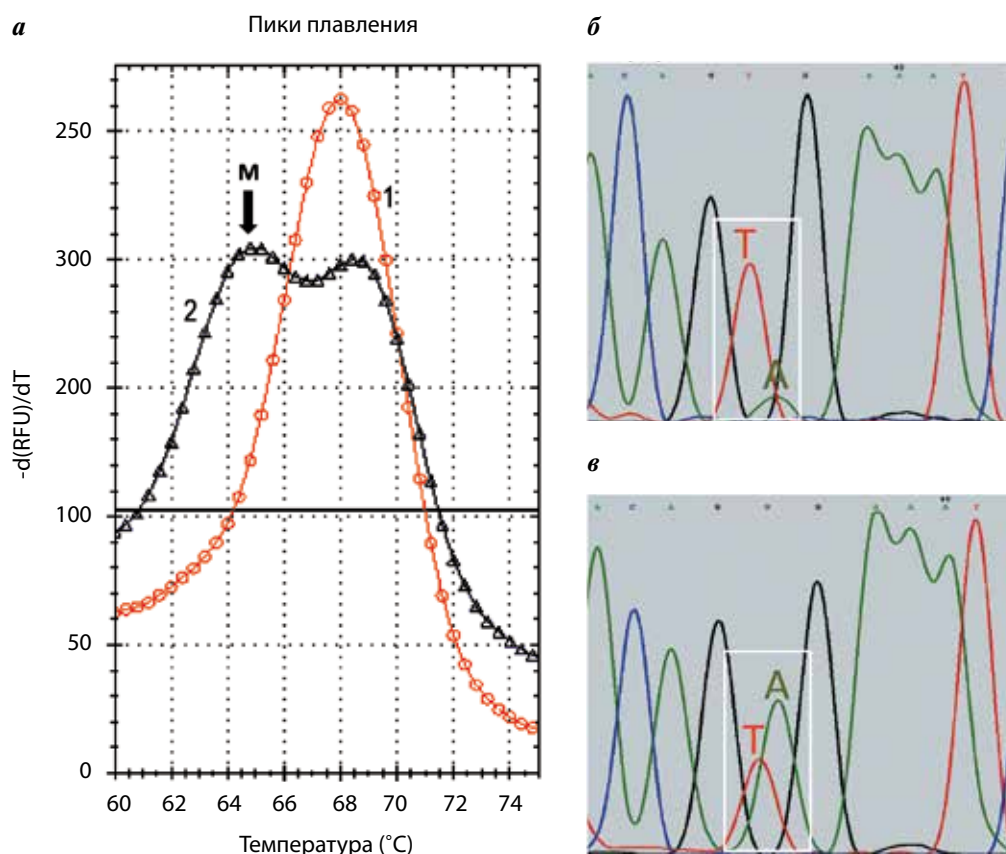


Рис. 6. Верификация секвенированием по Сэнгеру результатов мутационного сканирования (обозначения как на рис. 5): а — клинический образец ДНК (меланома) анализировали DMA_{st} и DMA_{mod} (кривые 1 и 2 соответственно); б, в — секвенирование ампликонов DMA_{st} и DMA_{mod} соответственно

шественную амплификацию мутантного аллеля, максимально подавив синтез аллеля «дикого» типа. Для этого были подобраны последовательности праймеров и зондов TaqMan, сокращена продолжительность цикла амплификации, снижена, по сравнению со стандартной, концентрация Taq-полимеразы и подобрана температура отжига праймеров и зондов, максимально дискриминирующая амплификацию «дикого» и мутантного аллелей. Таким способом удалось повысить чувствительность выявления мутантных аллелей более чем в 10 раз (в предварительных опытах анализа мутантного гена *KRAS* было достигнуто 100-кратное повышение чувствительности).

По сравнению с обычно используемыми для обогащения мутантных аллелей блокирующими агентами

(пептидными нуклеиновыми кислотами) [17] предлагаемый нами подход имеет ряд преимуществ: один и тот же зонд используется для количественной и качественной оценки участков генома и для «обогащения» мутантных аллелей, кроме того, нет необходимости в дорогостоящем химическом синтезе.

Таким образом, DMA_{mod} обладает высокой чувствительностью (что позволяет сократить число ложноположительных результатов клинической генодиагностики), прост в исполнении, экономичен и производителен.

Подана заявка на изобретение № 2016114041
«Способ сканирования генных мутаций в опухолях человека» (приоритет от 12.04.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E. et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339: 1546–58.
2. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–21.
3. Borrás E., Jurado I., Hernan I. et al. Clinical pharmacogenomic testing of *KRAS*, *BRAF* and *EGFR* mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer* 2011;11:406.
4. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C.A. Comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72: 2457–67.

5. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted *EGFR* blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40.
6. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486(7404):532–6.
7. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
8. Narayan A., Carriero N.J., Gettinger S.N. et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012;72(14):3492–8.
9. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206.
10. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with Taqman probes for detection of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations. *Anal Biochem* 2015;491:75–83.
11. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Asymmetric real-time PCR and multiplex melting curve analysis with TaqMan probes for detecting PIK3CA mutations. *Data Brief* 2015;5:913–7.
12. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4:357–62.
13. Schutz E., von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27:1218–24.
14. Montgomery J.L., Rejali N., Wittwer C.T. The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases. *J Mol Diagn* 2014;16(3):305–13.
15. Smith J., Modrich P. Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(13):6847–50.
16. McInerney P., Adams P., Hadi M.Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Mol Biol Int* 2014;2014:287430.
17. Guha M., Castellanos-Rizaldos E., Makrigiorgos G.M. DISSECT Method using PNA-LNA clamp improves detection of T790m mutation. *PLoS One* 2013;8(6):e67782.

Молекулярные детерминанты действия трансформирующего фактора роста бета-1 на клетки глиобластомы человека

В.Е. Шевченко¹, С.В. Ковалев², Н.Е. Арноцкая¹, З.Н. Никифорова¹, И.А. Кудрявцев¹,
Е.А. Савченко³, И.С. Брюховецкий^{4,5}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²химический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1;

³ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5;

⁴Школа биомедицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091, Владивосток, ул. Суханова, 8;

⁵ФГБУН «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Повышенная экспрессия трансформирующего фактора роста бета-1 (transforming growth factor beta1, TGF-β1) в злокачественных опухолях головного мозга способствует выживанию опухолевых клеток, увеличивая их рост, миграцию, инвазию, ангиогенез, супрессию иммунной системы.

Цель работы — методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить молекулярные механизмы действия TGF-β1 на клетки U87 глиобластомы человека.

Результаты. Идентифицированы внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF-β1 в онкогенезе злокачественных глиом и включающие дифференциально экспрессированные белки плотных межклеточных контактов, фокальной адгезии, деацетаз гистонов, теплового шока, семейства S100.

Заключение. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования глиобластомы и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста бета-1, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия, эпителиально-мезенхимальный переход, фокальная адгезия, плотные межклеточные контакты

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-50—59

Molecular determinants of transforming growth factor beta-1 action on human glioblastoma cells

V.E. Shevchenko¹, S.V. Kovalev², N.E. Arnotskaya¹, Z.N. Nikiforova¹, I.A. Kudryavtsev¹, E.A. Savchenko³, I.S. Bryukhovetskiy^{4,5}

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Build. 3, 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia;

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; 34/5 Vavilova St., Moscow, 119334, Russia;

⁴Biomedicine School, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok, 690091, Russia;

⁵A. V. Zhirmunsky Institute of Sea Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok, 690059, Russia

Background. Increased expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) in malignant brain tumors promotes cancer cells survival enhancing their growth, migration, invasion, angiogenesis, immune system suppression.

Objective is to study molecular mechanisms of TGF-β1 action on U87 human glioblastoma cells by means of proteomic high-resolution mass-spectrometry.

Results. We have identified intracell signal pathways responsible for TGF-β1 involvement in malignant gliomas oncogenesis including differential expressed proteins of tight cell junctions, focal adhesion, histone deacetylases, heat shock, S100 family.

Conclusions. Important patterns are determined that could be used for the development of new approaches for detection of glioblastoma metastasis candidate markers and potential therapy targets of this decease.

Key words: transforming growth factor beta-1, glioblastoma multiforme, proteome, mass-spectrometry, epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, tight cell junctions

Введение

Мультиформная глиобластома (Glioblastoma Multiforme, GBM) — наиболее распространенная первичная высоко инвазивная глиальная опухоль головного мозга человека с крайне неблагоприятным прогнозом [1]. Выживаемость больных при использовании всех современных протоколов комплексного лечения составляет 6–12 мес после постановки диагноза из-за инфильтративной и агрессивной природы GBM [2]. Инвазия/инфильтрация опухолевых клеток и их пролиферация остаются главными причинами смерти больных злокачественными глиомами [3]. Поэтому в последнее время уделяется повышенное внимание изучению сигнальных путей, вовлеченных в развитие глиобластомы. Лучшее понимание молекулярных механизмов онкогенеза GBM в конечном счете должно привести к открытию новых терапевтических мишеней, которые обеспечат более эффективные методы лечения этого заболевания [4].

Среди многих сигнальных путей, связанных с глиомами, сигналинг с участием трансформирующего фактора роста бета (transforming growth factor beta, TGF- β) играет важную роль в регулировании поведения этих опухолей [5]. Сообщалось о повышенных уровнях TGF- β в сыворотке крови и опухолевой ткани пациентов со злокачественной глиомой, наблюдалась отчетливая корреляция повышенного уровня TGF- β со степенью злокачественности и распространенностью опухолевого процесса, плохим прогнозом для больных. Высказывается предположение о прямом участии этого сигнального пути в молекулярных механизмах, связанных со злокачественностью глиом [5]. Опубликованы данные о том, что TGF- β может вызывать прогрессию опухолевого процесса по аутокринному механизму [6].

TGF- β относится к цитокинам, которые участвуют в регуляции эмбрионального развития и гомеостаза ткани [7]. На клеточном уровне TGF- β влияет на такие процессы, как рост, выживание, дифференцировка, миграция клеток и активация иммунитета в зависимости от типа клеток и клеточного контекста. Свои действия TGF- β осуществляет через сложную сеть различных лигандов и рецепторов, проводящих соответствующие сигналы [7]. При раке сигнальный путь TGF- β выполняет как супрессорные, так и промотирующие функции. TGF- β считают опухолевым супрессором, поскольку он является мощным ингибитором пролиферации эпителиальных клеток, астроцитов и иммунцитов. Некоторые опухоли приобретают устойчивость к цитостатическому действию TGF- β в результате мутаций в отдельных элементах сигнального пути TGF- β . Определенные злокачественные опухоли, включая глиомы, селективно теряют способность TGF- β ингибировать пролиферацию, сохраняя другие их функции неизменными [7]. В таких опухолях TGF- β может вызывать пролиферацию, ангиогенез, инвазию, метастазирование и супрессию иммунитета. Таким образом, TGF- β играет двойную роль в канцерогенезе и, в зави-

симости от стадии и типа опухоли, он действует как супрессор опухоли или как канцерогенный фактор [8]. Такое переключение от опухолевой супрессии к онкогенной активности известно как «парадокс TGF- β » [9]. Несмотря на заметный прогресс в изучении сигнального пути TGF- β , его роль в онкогенезе глиом недостаточно ясна.

Особый интерес представляют данные о модуляции TGF- β эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Индукция ЭМП приводит к метастатической инвазии многих карцином, однако до конца его роль остается непонятной, особенно в случае глиобластом. Недавние исследования связывают ЭМП с генерацией опухолевых стволовых клеток [10]. Молекулярные механизмы TGF- β индукции ЭМП в глиобластомах мало изучены. Тем не менее представленные в настоящее время данные указывают на важную роль сигнального пути TGF- β на поздних этапах развития опухолевого процесса в глиомах, включая инвазию, и делают его потенциальным кандидатом для таргетной терапии.

В настоящей работе впервые методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучали молекулярные механизмы действия TGF- β 1 на клетки U87 глиобластомы человека. Идентифицированы внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе злокачественных глиом и включающие дифференциально экспрессированные белки (ДЭБ) плотных межклеточных контактов (ПМК), фокальной адгезии, деацетаз гистонов (histone deacetylases, HDAC), теплового шока (heat shock proteins, HSP), семейства S100. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования глиобластомы и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

Экспериментальная часть

Реактивы. Для всех процедур использовали дистиллированную воду, очищенную и обессоленную с помощью Milli-Q (Millipore Corporation, США). Ацетонитрил (ACN) HPLC gradient grade был получен из Prolabo (США); 98–100 % муравьиная кислота (FA) — из Merck (США); гидрокарбонат аммония NH_4HCO_3 , дитиотреитол, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (TCEP), трифторуксусная кислота (TFA) и мочевины — из Fluka (USA); 99,7 % уксусная кислота, 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол (TFE), TGF- β 1, иодацетамид и трипсин, метилированный по лизинам — из SigmaAldrich (США); соляная кислота (чистая) и хлорид калия (KCl) (чистый) — из Химмед (Россия).

Клеточные культуры. Клетки линии U87 культивировали при температуре +37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO_2 в среде DMEM (Gibco, Life Technologies, Россия) с низким содержанием глюкозы с глутамином с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина

(100 мкг/мл) в общем объеме 15 мл в пластиковых флаконах для культур клеток (75 см²) (Corning Costar, США). При достижении 70 % монослоя (после 48 ч роста) клетки трехкратно осторожно отмывали 15 мл среды DMEM с глутамином и культивировали в бесывороточной среде с добавлением 5 нг/мл TGF- β в течение 24 ч при температуре +37 °С. Все клеточные линии выращивали в 3 экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали.

Получение лизатов линий опухолевых клеток U87.

Клетки монослойной культуры снимали с культуральных флаконов, осаждали центрифугированием со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин, супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 3 мл фосфатного буферного раствора (pH 7,4) и вновь осаждали центрифугированием. Отмывку клеток осуществляли 3 раза. Перед последним центрифугированием проводили подсчет клеток по стандартному методу в камере Горяева с трипановым синим. Клетки в количестве $(1-3) \times 10^6$ ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера. Готовили 1 мл лизирующего буфера (Sigma Aldrich, США). Для этого смешивали 200 мкл буфера (250 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 200 мкл 750 mM хлорида натрия (NaCl); 200 мкл 0,5 % додецилсульфата натрия (Lauryl sulfate); 200 мкл 2,5 % дезоксихолевой кислоты; 200 мкл 5 % игепала; 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз. Все процедуры выполняли при температуре +4 °С. К клеткам добавляли 1 мл лизирующего буфера. Инкубировали на протяжении 15 мин в охлаждаемом шейкере Eppendorf Thermomixer Comfort (Германия). Центрифугировали в течение 1 ч в охлаждаемой центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415 F (Германия). Супернатант отбирали для дальнейшего исследования. Полученные в результате лизиса образцы очищали от низкомолекулярных соединений с помощью Agilent Spin Concentrators for Proteins 5 кДа (США).

Очистка клеточных лизатов от низкомолекулярных соединений. Образец (300–500 мкл в зависимости от количества лизированных клеток) вносили в концентратор 5 кДа, добавляли 4,0 мл 8 М мочевины в 0,1 М Tris-HCl и центрифугировали со скоростью 3000 об/мин до того момента, когда над фильтром оставалось 300 мкл жидкости. Подобную промывку повторяли 4 раза с 4,0 мл воды (MilliQ). Полученные 300 мкл образца ресуспендировали и отбирали. Дополнительно образец смывали с концентратора дважды по 200 мкл воды (MilliQ). В итоге полученные 700 мкл образца использовали для дальнейшего исследования: измеряли общий белок по поглощению на длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo, США). Принимали, что 1 единица оптической плотности соответствует 1 мг общего белка в 1 мл раствора. Рассчитывали количество лизата, в котором содержится 300–400 мкг белка и упаривали при температуре +30 °С в центрифужном испарителе Labconco CentriVar (США) до объема 10–20 мкл (если масса белка была < 300 мкг, то упаривали весь лизат).

Энзиматический гидролиз (трипсинолиз) образцов.

К высушенным лизатам добавляли по 25 мкл TFE, по 25 мкл 100 mM водного раствора NH_4HCO_3 и по 2 мкл свежеприготовленного 50 mM водного раствора TCEP. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при температуре +60 °С, затем охлаждали до +25 °С, добавляли по 1 мкл свежеприготовленного 84 mM водного раствора иодацетамида и выдерживали 30 мин при температуре +25 °С, после чего добавляли по 100 мкл 100 mM раствора NH_4HCO_3 , по 300 мкл воды и раствор трипсина в 1 mM соляной кислоте (концентрация трипсина 1 мкг/мкл, соотношение трипсин:белок 1:50 по массе) и выдерживали 18 ч при температуре +37 °С. По 4 мкл растворов анализировали масс-спектрометрически для контроля проведения трипсинолиза. По окончании реакции содержимое пробирок упаривали досуха при температуре +30 °С на центрифужном испарителе Labconco CentriVar, а затем подвергали лиофильной сушке в течение ночи для полного удаления бикарбоната аммония.

Разделение триптических пептидов. Триптические пептиды растворяли в мобильной фазе А (30 % ACN, 70 % воды, 0,1 % FA, pH 2,7) так, чтобы в 20 мкл раствора было 100 мкг общего белка, и разделяли на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды), снабженном коллектором фракций, на катионообменной колонке MIC-10-CP (материал Poros 10S, 1 мм $\times$ 10 см, Dionex, США): объем инжестируемой пробы 20 мкл, поток растворителя 30 мкл/мин, температура колонки +25 °С, детекция по ультрафиолетовому поглощению при длинах волн 214 и 281 нм. Растворители: мобильная фаза А – 30 % ACN, 70 % воды, 0,1 % FA; мобильная фаза В – мобильная фаза А + 500 mM KCl. Градиент: 0–5 мин 0 % фазы В, 5–85 мин 0–20 % фазы В, 85–89 мин – 20–100 % фазы В, 89–94 мин 100 % фазы В, 94–95 мин 100–0 % фазы В, затем уравнивание колонки в течение 30 мин на фазе А. Собирали 24 фракции со 2-й по 50-ю минуту через равные промежутки времени в 2 мин. Полученные фракции упаривали досуха при температуре +30 °С на центрифужном испарителе, а затем перерастворяли в 100 мкл 0,1 % водного раствора FA.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили на нанопоточном хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды) в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo) с источником ионизации NSI. Разделение пептидов осуществляли на колонке Acclaim C18 PepMap100 (75 мкм $\times$ 150 мм, размер зерна 3 мкм, Dionex), снабженной предколонкой. Образец (20 мкл) загружали на предколонку в течение 1 мин в 99,9 % воды/0,1 % FA, затем отмывали от соли 4 мин 0,1 % раствором TFA в воде и еще 1 мин уравнивали 99,9 % воды/0,1 % FA; скорость потока 30 мкл/мин. Условия хроматографирования: скорость потока 0,3 мкл/мин, мобильная фаза А – 95 % воды/5 % диметилсульфоксида (DMSO)/0,1 % FA, мобильная фаза В – 10 % воды/5 %

DMSO/85 % ACN/0,1 % FA. Градиент: 0–6 мин 20 % фазы В, 6–126 мин 20–45 % фазы В, 126–150 мин 45–100 % фазы В, 150–160 мин 100 % фазы В, 160–165 мин 100–0 % фазы В, продолжительность анализа 175 мин. Масс-спектры (МС) регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 300–2000 Да, напряжение на игле 2,0 кВ, температура источника +275 °С, напряжение на капилляре 29,48 В, на линзе 120 В. МС регистрировали в орбитальной ловушке в режиме FT (разрешение 30 000, число накапливаемых ионов 1×10^6 , максимальное время накопления 700 мс, 1 микро-скан), спектры МС/МС получали при ионизации, обусловленной соударениями (CID) в линейной ловушке (режим сканирования Enhanced, число накапливаемых ионов 1×10^4 , максимальное время накопления 150 мс, 1 микро-скан, энергия соударений 35 % от максимальной). Спектры МС/МС регистрировали для 12 самых интенсивных ионов. Динамическое исключение включалось после регистрации 1 спектра, время исключения 1 мин. Вторичной фрагментации подвергали ионы с зарядом больше +1.

Анализ данных. Для идентификации белков МС использовали программу MaxQuant v1.5.2.8. Для обработки данных и идентификации белков применяли параметры по умолчанию. Исключения: база данных SwissProt_human (версия 2015_04), энзим – трипсин, число пропущенных разрывов 2, фиксированные модификации – карбамидометилирование, возможные модификации – ацетилирование N-конца белка, окисленный метионин, пироглутамин и пироглутаминовая кислота, точность масс родительского иона для первичного поиска 25 ppm, для основного поиска после перекалибровки – 6 ppm, фрагментов 0,8 Да, минимальная длина пептидов 5 аминокислот, максимальная – 100, максимальная масса пептидов 7000 Да, опция зависимые пептиды включена. Для количественного расчета использовали метод label-free (без метки) для всех идентифицированных пептидов. Таблицу идентифицированных семейств белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости отличий в уровнях белков, полученных методом label-free. Значимыми считали отличия на уровне достоверности $p < 0,05$ для парного t -критерия Стьюдента.

Результаты

Мы использовали label-free количественный протеомный nano-LC–MS/MS метод для детектирования и сравнения ДЭБ в лизатах линии клеток глиобластомы человека U87 до и после обработки их TGF- β 1. Анализ триптических пептидов по их 328 312 спектрам МС/МС с помощью программного пакета MaxQuant просеквенировал 2589 протеинов по 19 748 (15 309 уникальных) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения

(a false discovery rate) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. Из них 2482 белка идентифицировали по 19 555 (15 119 уникальных) пептидам в контрольных клетках U87 и 2566 белков – по 19 695 (15 257 уникальных) пептидам в клетках U87 после стимуляции TGF- β 1. Для всех линий клеток ~91 % белков идентифицировали по более чем 2 пептидам. Диапазон молекулярного веса протеинов изменялся от 1,91 до 3713,70 кДа, из них 896 имели молекулярный вес до 30 кДа; 1280 – 30–100 кДа; 371 – 100–300 кДа; 26 – 300–500 кДа; 16 – более 500 кДа. Процент покрытия анализируемых белков варьировался от 0,3 до 100 %, из них 1446 белков с покрытием до 20 %, 658 – 20–40 %, 315 – 40–60 %, 170–60–100 %. Коэффициент корреляции Пирсона для данных образцов клеток U87 до и после стимуляции TGF- β 1 был 0,904–0,952.

Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для 2 клеточных популяций. Во всех клеточных лизатах детектировались 2459 (95 % от 2589) белков, только в клетках U87 – 23 и 107 протеинов были уникальными для клеток U87 после их стимуляции TGF- β 1.

Статистически значимые ($p < 0,05$) изменения в экспрессии после обработки клеток TGF- β 1 зарегистрированы для 656 белков. Изменял экспрессию более чем в 2 раза 281 протеин, увеличивали 160 протеинов, а уменьшал 121 протеин. Повышение экспрессии более чем на порядок наблюдали у рецепторо-ассоциированного протеина ангиотензина II типа, инверсина, протеина CYR61, гуанозинтрифосфатсвязывающего протеина RAD, энолазы, миозина-14, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-3, фактора роста соединительной ткани, индуцированного сигналом и связанного с пролиферацией подобного 1 белка 3. Одновременно снижение экспрессии более чем на порядок отмечали для кератиноассоциированного протеина 3–3, кератина типа II кутикулярного Hb2, предполагаемого кератина-87, гомолога-2 семейства фермитинов, N-ацетилтрансферазы-10, кератина типа I кутикулярного Ha4.

Динамический диапазон для идентифицированных белков составляет 6 порядков (от $4,1 \times 10^8$ до 363), что позволяет выявить низкокопийные белки, такие как коффилин-2, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов, и др. Также были идентифицированы специфические маркеры мезенхимальных (CD44, интегрин $\alpha 5$ и $\beta 1$) и прогениторных (член A3 семейства альдегиддегидрогеназы-1) стволовых клеток глиобластомы и маркеры пронеурональной дифференцировки (тубулин $\beta 3$, нестин) нейральных прогениторных стволовых клеток. Во всех 2 образцах идентифицировали 2296 белков.

Полученные данные протеомного картирования белков различных типов клеток были подвергнуты сравнительному биоинформационному анализу. В дальнейшем были включены в анализ каждой из групп сравнения только те белки, у которых нормализованная

сигнальная интенсивность изменилась статистически значимо ($p < 0,05$).

Каждый идентифицированный белок, удовлетворяющий вышеназванным требованиям, классифицировали в соответствии с его клеточной локализацией на основании информации, доступной в базах данных Swiss-Prot, Gene Ontology и других открытых базах. Также учитывали тот факт, что если 1 белок находился более чем в 1 клеточном компартменте. По данным открытых баз, 656 белкам, изменившим экспрессию при стимуляции, соответствовали 506 генов. Клеточное распределение белков с известной локализацией, кодируемых этими генами, включало: клеточную часть (GO:0044464) – 43,8 %; органеллы (GO:0043226) – 28,0 %, макромолекулярный комплекс (GO:0032991) – 15,2 %, мембраны (GO:0016020) – 7,1 % и внеклеточный регион (GO:0005576) – 3,4 %.

Протеины картировали по биологической роли в клетке, молекулярной функции и функциональному классу в соответствии с протеомно-геномной аналитической программой PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships).

Основная часть ДЭБ участвовала в метаболических (GO:0008152; 28,8 %) и клеточных (GO:0009987; 21,9 %) процессах, а также в процессах биологической регуляции (GO:0065007; 8,8 %) и локализации (GO:0051179; 8,7 %). Большая часть ДЭБ проявляла каталитическую (GO:0003824; 34,8 %), связывающую (GO:0005488; 30,6 %), структурно-молекулярную (GO:0005198; 16,3 %), энзим-регуляторную (GO:0030234; 6,0 %), транскрипционную для связывания нуклеиновых кислот (GO:0001071; 2,8 %) и рецепторную активность (GO:0004872; 2,6 %). Основная часть ДЭБ представлена следующими классами: связывающие нуклеиновые кислоты (PC00171; 14,6 %), белки цитоскелета (PC00085; 11,2 %), гидролазы (PC00121; 9,0 %), трансферазы (PC00220; 7,7 %) и модуляторы энзимов (PC00095; 7,3 %).

Из 2589 идентифицированных белков мы рассчитали количество протеинов ($n = 656$), экспрессия которых статистически значимо изменялась при стимуляции клеток U87 фактором TGF- β 1. Основной биоинформационный анализ проводили с этой группой белков.

Для лучшего понимания биологических процессов и путей, включенных в TGF- β -индуцированные отклики, мы провели развернутый биоинформационный анализ с использованием KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и биологических процессов GO (Gene Ontology). Отмечали значительное обогащение генов для процессов, которые могут быть включены в ЭМП [11]. К ним относятся: ПМК, фокальная адгезия, актиновый цитоскелет и др. Поэтому при анализе полученных данных этим процессам уделяли повышенное внимание. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Статистически значимо увеличивали экспрессию при действии TGF- β 1 на клетки U87 пять белков (миозин, тяжелая цепь 14 (NM11C); немускульный миозин, тяжелая цепь 9 (NM11A); регуляторная

субъединица Б альфа изоформы протеинфосфатазы-2; катенин, альфа-1, 102 кДа; актинин, альфа-1), участвующие в образовании ПМК (см. табл. 1). Повышенную экспрессию у белков, связанных с фокальной адгезией, наблюдали у 12 протеинов (см. табл. 2), из них: у тромбоспондина-1; фибронектина-1; коллагена, тип I, альфа-2; протеинтирозинкиназы-2; тенасцина C; подобной Rho-ассоциированной, биспиральной протеинкиназы-1 и рецептора фактора роста, связанного с протеином-2, экспрессия увеличивалась более чем в 2 раза.

Обсуждение

В настоящее время нет доказательств возможной антионкогенной активности сигнального пути TGF- β в глиомах, такой как индукция старения, которая наблюдается при эпителиальном раке [7]. Обнаружена повышенная экспрессия TGF- β в злокачественных опухолях головного мозга, увеличивающая рост опухолевых клеток, их миграцию, инвазию, ангиогенез, супрессию иммунной системы [12]. TGF- β в глиомах секретируется как по аутокринному механизму клетками глиомы, так и образуется микроглиальными клетками. Аутокринную секрецию TGF- β наблюдали в клеточных линиях или в клетках, полученных из хирургически удаленных злокачественных глиом [13].

Суперсемейство TGF- β играет решающую роль в морфогенезе и спецификации потомков клеток в процессе развития мозга [14]. Н. Ikushima и соавт. показали, что аутокринный TGF- β -сигналинг очень важен для поддержания стволовости у стволовых клеток глиомы [15]. Инкубация клеток глиобластомы с TGF- β

Таблица 1. Изменение экспрессии белков, участвующих в образовании плотных межклеточных контактов, после стимуляции TGF- β 1 клеток U87

Индекс гена	Название белка	TGF- β /Control
ACTB	Актин, бета	0,75
ACTG1	Актин, гамма-1	0,74
ACTN1	Актин, альфа-1	1,34
CTNNA1	Катенин, альфа-1, 102 кДа	2,09
CSNK2B	Казеинкиназа-2, бета полипептид	0,76
MYH14	Миозин, тяжелая цепь 14 (NM11C)	16,91
MYH9	Миозин, тяжелая цепь 9, немускульный (NM11A)	3,78
PRKCA	Протеинкиназа C, альфа	0,38
PPP2R2A	Протеинфосфатаза-2, регуляторная субъединица Б, альфа изоформа	2,90
RAB13	RAB13, член семейства онкогенов RAS	0,72
RRAS2	Связанный вирусный (r-ras) гомолог онкогена 2	0,53
TJP2	Белок плотных контактов 2	0,71

Таблица 2. Изменение экспрессии белков фокальной адгезии после стимуляции TGF- β 1 клеток U87

Индекс гена	Название белка	TGF- β /Control
CAPN2	Кальпаин-2, (м/II) большая субъединица	0,71
CAV1	Кавеолин-1	0,63
COL1A2	Коллаген, тип I, альфа-2	3,11
COL6A1	Коллаген, тип VI, альфа-1	1,58
FN1	Фибронектин-1	3,53
FLNB	Филамин Б, бета	1,27
FYN	FYN-протоонкоген	1,45
GRB2	Рецептор фактора роста, связанный с протеином-2	2,07
ITGAV	Интегрин, альфа-5	1,58
MAP2K1	Митогенактивируемая протеинкиназа киназы-1	0,67
PRKCA	Протеинкиназа C, альфа	0,38
PTK2	Протеинтирозинкиназа-2	2,92
ROCK1	Rho-связанная протеинкиназа-1	2,13
ROCK2	Rho-связанная протеинкиназа-2	1,51
THBS1	Тромбоспондин-1	7,93
TLN1	Талин-1	0,89
TLN2	Талин-2	0,80
TNC	Тенасцин C	2,40

увеличивала число нейросфер в первичной культуре клеток опухоли головного мозга дозозависимым образом, показывая, что TGF- β повышает способность к самовозобновлению стволовых клеток глиомы [16].

В табл. 1 представлены белки, отвечающие за ПМК, которые меняют экспрессию в клетках U87 при действии TGF- β 1. Карта сигнальных путей, связанных с ПМК, изображена на рис. 1 (KEGG PATHWAY Database). Специализированные комплексы белков поверхности клеток формируют эпителиальные межклеточные соединения, которые важны для целостности эпителия. Клетки связываются друг с другом через субапикальные плотные контакты, адгезивные контакты, десмосомы и разрозненные контакты на латеральных поверхностях. После инициирования ЭМП эти контакты нарушаются и соединительные белки релокализуются и/или деградируют. Разрушение ПМК в процессе ЭМП сопровождается снижением экспрессии клаудина и окcludина и диффузией белка плотных контактов 1 (TJP1) из ПМК [17]. Во время дестабилизации адгезивных контактов эпителиальный кадгерин (Е-кадгерин) расщепляется в плазматической мембране и впоследствии деградирует [18]. После действия TGF- β 1 мы не отме-

чали статистически значимого изменения в экспрессии TJP1, в то время как уровни TJP2 снизились в 1,74 раза (см. табл. 1). TJP2 показывал положительную корреляцию с выживаемостью больных GBM [19]. Это говорит о том, что возможен баланс между матриксными металлопротеиназами и протеинами ПМК, который необходим для поддержания гематоэнцефалического барьера в GBM. Сдвиг в этом балансе может вызывать появление более агрессивного фенотипа, связанного с отеком мозга и инвазивностью опухолевых клеток [19].

PPP2R2A, известная как B55 α , является регуляторной субъединицей протеин серин/треонин фосфатазы A2 (PP2A). В раковых клетках снижение активности PP2A индуцирует активацию различных киназ, связанных с пролиферацией клеток, и промотирует опухолевую прогрессию [20]. PP2A регулирует многие внутриклеточные процессы, включая клеточный сигналинг, клеточный цикл, метаболизм, апоптоз и синтез протеинов [21]. Роль этой системы в молекулярных механизмах регуляции клеточных процессов TGF- β 1 практически не изучена. Имеются единичные данные об участии PP2R2A в TGF- β -индуцированном аресте пролиферации клеток [22]. TGF- β 1 увеличивал экспрессию PP2R2A в клетках U87 почти в 3 раза (см. табл. 1), что подтверждает ранее полученные данные [22].

Биоинформационный анализ показал высокое обогащение белками, участвующими в фокальной адгезии. Карта сигнальных путей фокальной адгезии изображена на рис. 2 (KEGG PATHWAY Database). В табл. 2 представлены ДЭБ, модулирующие этот процесс. Заметное повышение экспрессии под действием TGF- β 1 наблюдали для тромбоспондина-1 (в 7,93 раза), фибронектина-1 (в 3,53 раза), коллагена, тип I, альфа 2 (в 3,11 раза). Известно, что ЭМП активизирует экспрессию адгезивных молекул нейтральных клеток (neural cell adhesion molecule, NCAM), которые взаимодействуют с нейрональным кадгерином (N-кадгерином), для модуляции активности рецепторов тирозинкиназ [18]. NCAM взаимодействуют с FYN-киназой (нерецепторной тирозинкиназой src-семейства), ослабляя блок фокальной адгезии, миграции и инвазии [23]. Мы установили изменение экспрессии FYN-киназы в 1,45 раза и протеинтирозинкиназы-2 (PTK2) в 2,92 раза (см. табл. 2). Ремоделирование внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM) и изменение взаимодействия клеток с ECM важны при иницировании и прогрессии ЭМП. Интегриновые комплексы позволяют клеткам получать сигналы от белков ECM через взаимодействие с сигнальными медиаторами, такими как интегринсвязанная киназа (ILK) и парвин [18]. После обработки TGF- β 1 клеток U87 в течение 24 ч наблюдали незначительное увеличение (в 1,18 раза) экспрессии ILK и отсутствие изменений у парвин- α , в то время как уровни парвин- β снижались в 1,51 раза. Изменения интегринового репертуара в процессе ЭМП коррелируют с увеличенной экспрессией протеаз, та-

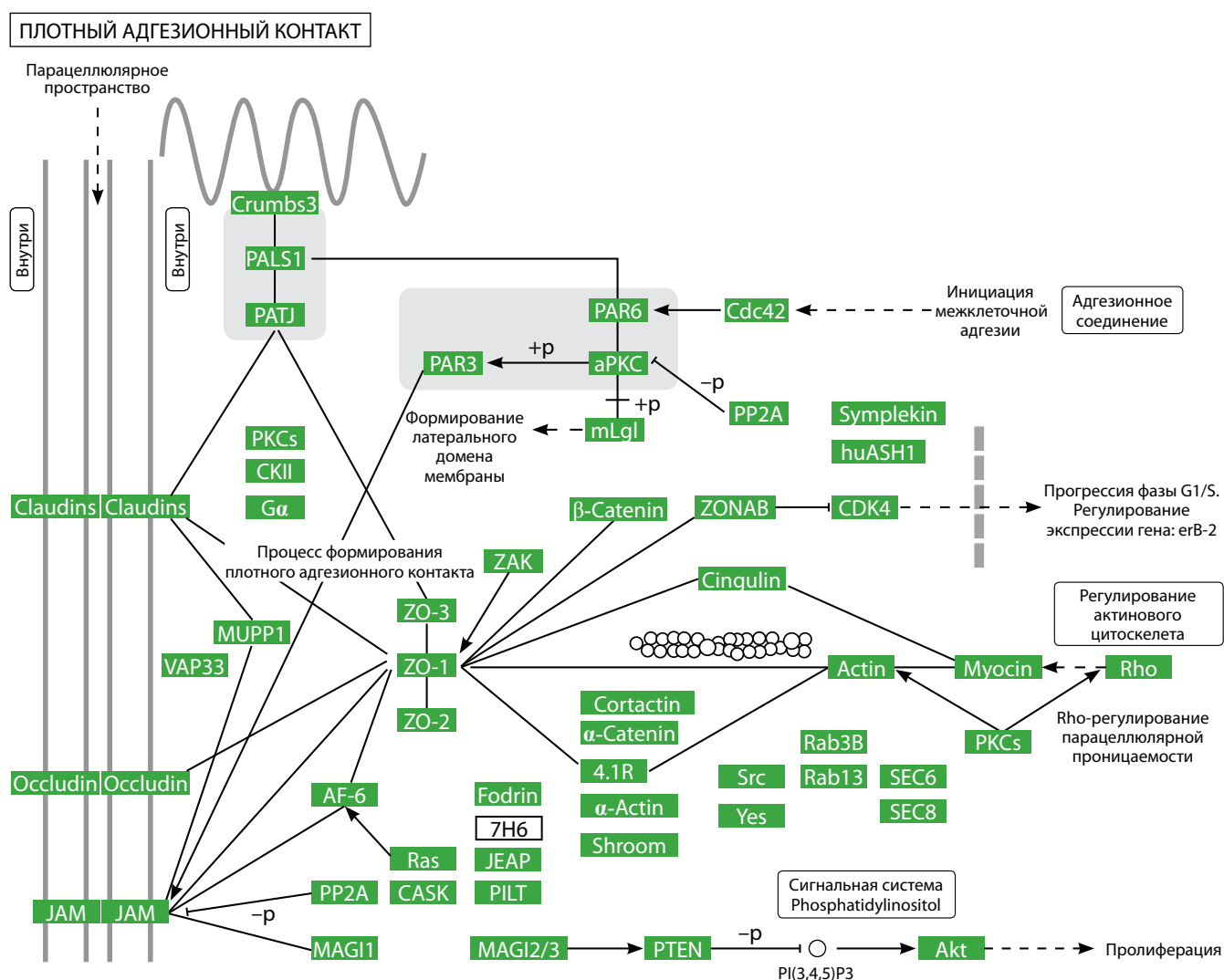


Рис. 1. Сигнальные пути, связанные с образованием плотных межклеточных контактов (KEGG PATHWAY Database)

ких как матричные металлопротеиназы MMP2 и MMP9, таким образом усиливая деградацию белков ECM и способствуя инвазии [24]. В этой связи мы отметили значительное увеличение (в 3,96 раза) экспрессии MMP2.

Rho-связанные протеинкиназы 1 (ROCK1) и 2 (ROCK2), серин/треонин протеинкиназы влияют на инвазию и миграцию клеток, изменяя статус цитоскелета. В последние годы было установлено, что ROCK1 сверхэкспрессируется в различных опухолях. Отмечено, что фактор роста эндотелия сосудов C (vascular endothelial growth factor, VEGF-C) вызывал метастазирование рака шейки матки через активацию и регуляцию сигнального пути RhoA/ROCK2/миезин [25]. При активации клеток глиобластомы TGF-β1 мы наблюдали статистически достоверное увеличение экспрессии миезина в 1,25 раза и ROCK2 в 1,51 раза. Повышенная экспрессия ROCK1 в ткани глиомы положительно коррелировала с ее злокачественностью. Результаты предварительных исследований показали, что пролиферацию и метастазирование клеток GBM можно

ингибировать, подавляя экспрессию ROCK1, который рассматривают в качестве новой мишени для терапии GBM [26]. Как видно из табл. 2, при действии TGF-β1 наблюдается увеличение экспрессии ROCK1 в 2,13 раза.

Повышенное содержание ECM в микроокружении глиомы играет решающую роль в поддержании морфологии ее клеток, пролиферации и дифференцировки. Фибронектины (fibronectins, FNs) являются основными компонентами ECM во многих солидных опухолях, включая GBM. В ряде работ отмечено высокое содержание FNs в ECM сфероидов глиом в опытах *in vitro* и *in vivo* [27]. Как видно из табл. 2, экспрессия FN1 значительно возрастает (в 3,53 раза) в клетках U87 при действии TGF-β1.

Важность эпигенетических альтераций при злокачественных новообразованиях хорошо известна. HDAC вовлекаются в структуру хроматина и регулируют транскрипцию генов, изменяя экспрессию при злокачественных глиомах. Ингибиторы HDAC использовали в попытке остановить рост и вызвать апоптоз раковых

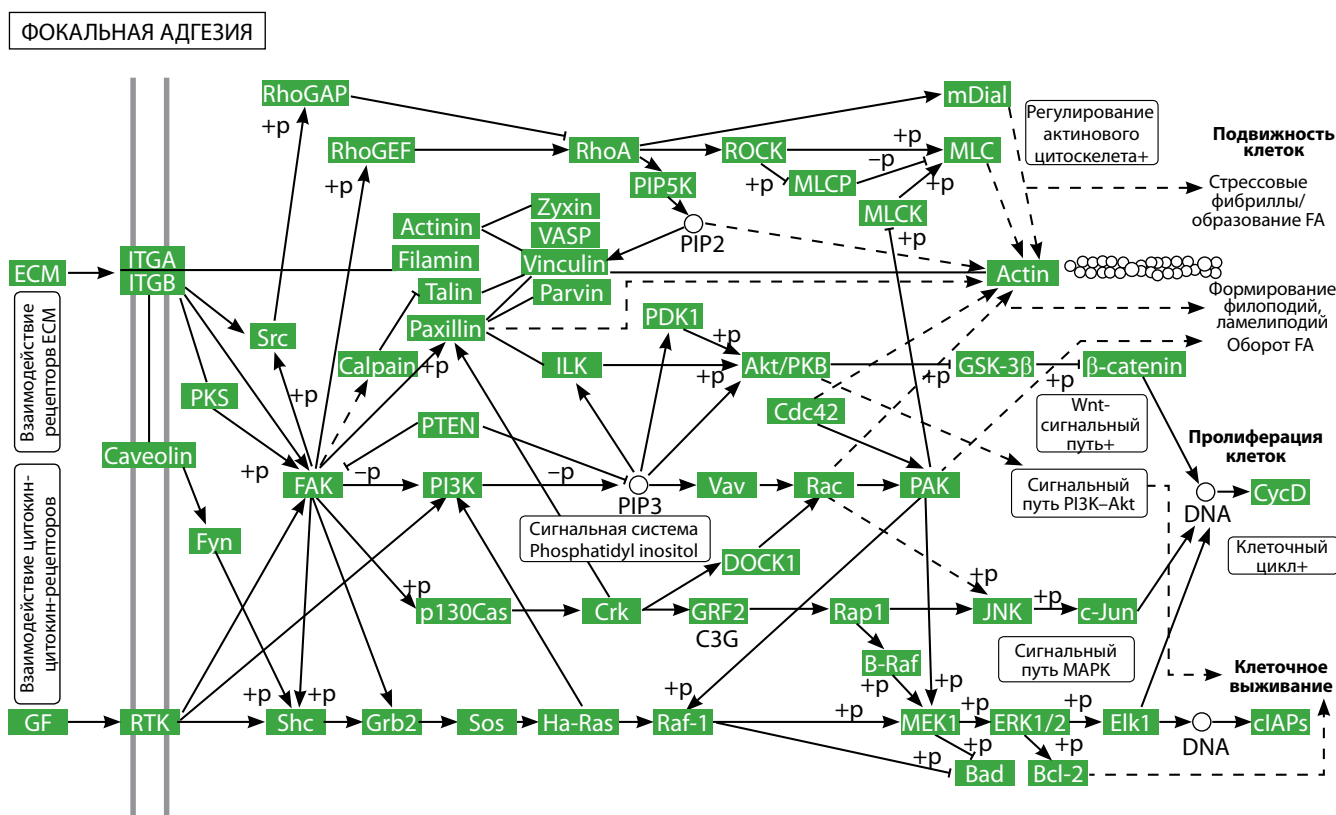


Рис. 2. Сигнальные пути, связанные с фокальной адгезией (KEGG PATHWAY Database)

клеток. Ацилазы гистонов (histone acetyltransferases, HAT) и гиперацетилирование гистонов также вызывают деградацию HIF-1α и снижение уровня VEGF и, таким образом, приводят к антиангиогенным эффектам [28]. Лечение ингибиторами HDACs уменьшало пролиферацию полученных из глиобластомы стволовых клеток и вызывало их дифференцировку [29]. Анализ полученных данных выявил увеличение экспрессии HDAC1 в 1,48 раза, HDAC2 – в 1,31 раза и значительное (в 3,10 раза) повышение экспрессии HAT1.

HSP (особенно HSP90) – молекулярные шапероны, которые помогают в стабилизации белков-клиентов, таких как протеинкиназы и ряд транскрипционных факторов. HSP90 является необходимым элементом злокачественной трансформации, увеличения роста, выживания и инвазивности раковых клеток. HSP стабилизируют экспрессию рецептора эпидермального фактора роста vIII (EGFRvIII) и vIV (EGFRvIV) и, вероятно, поддерживают инвазивность GBM [30], их экспрессия незначительно росла при действии TGF-β1 на клетки U87. Самое заметное (в 1,86 раза) изменение наблюдали у HSP90AA4P.

Белки семейства 14-3-3 (фосфосерин-/фосфотreonинсвязывающие белки) имеют 7 изоформ (b, r, 3, d, q, h и z), которые принимают схожую подковообразную структуру, способную закреплять pS/T-остатки [31]. Роль белков 14-3-3 в злокачественных опухолях и их взаимодействие с различным опухолеродными генами и генами-супрессорами опухоли сложна и ма-

ло изучена [32]. Предыдущие исследования продемонстрировали, что иммунореактивность изоформ 14-3-3b, 3, d, q, h и z наблюдалась в большинстве образцов с астроцитом, и их иммунореактивные показатели заметно увеличивались с ростом стадии заболевания [33]. Были идентифицированы 14-3-3b и 14-3-3h как 2 опухолевоспецифические изоформы 14-3-3 в астроцитоме, которые рассматриваются в настоящее время как потенциальные мишени для генотерапии [34]. Показано, что 14-3-3b регулирует пролиферацию клеток глиомы через GSK3b-связанный сигнальный путь [35]. Однако точная роль 14-3-3b в человеческих GBM еще не изучена. В нашем эксперименте экспрессия белков 14-3-3 статистически значимо не изменялась при действии TGF-β1 на клетки U87.

Белки S100, такие как S100B, S100A2, S100A4, S100A6 и S100P, гиперэкспрессированы в первичных опухолях многих видов рака, в том числе молочной железы, головного мозга, легких, поджелудочной железы, предстательной железы и толстой кишки [36]. К тому же повышенная экспрессия этих белков в первичной опухоли часто ассоциируется с плохим прогнозом заболевания, как полагают, из-за их способности индуцировать миграцию и метастазирование опухолевых клеток [37]. Увеличение экспрессии некоторых белков S100 в клетках с помощью трансфекции может модулировать цитоскелет и усиливать миграцию клеток во многих модельных системах *in vitro* [37]. Основные молекулы актомиозинового цитоскелета

в опухолевых клетках являются изоформами немускульного миозина IIs (non-muscle myosin IIs, NMPIs), NMPIA, NMPIB и NMPIIC. NMPIA связан с организацией стресс-фибрилл, фокальных участков адгезии и тканевой архитектурой. NMPIB участвует в стабилизации нормальной полярности клеток и имеет важное значение для развития сердца и мозга. NMPIIC — недавно открытая изоформа, функция которой мало изучена, но она может действовать совместно с NMPIA и NMPIB [37].

В лизатах линии опухолевых клеток U87 до и после обработки их TGF- β 1 мы идентифицировали 9 членов этого семейства белков: S100P, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A13, S100A16. Заметное увеличение экспрессии отмечали для S100A7 (в 1,93 раза) и S100P (в 1,54 раза). На фоне изменения их уровней зарегистрировали значительное повышение экспрессии NMPIA и NMPIIC в 3,78 и 16,91 раза соответственно.

Нокдаун NMPIA заметно усиливал эффект S100P, направленный на повышение миграции клеток, что свидетельствовало о том, что он является основным эффектором сигнального пути S100P, который различным образом взаимодействовал с NMPI-изоформами с наибольшим сродством к NMDA ($\geq$ NMPIIC $\geq$ NMPIB) [37].

Заключение

В данной работе впервые изучены молекулярные механизмы действия TGF- β 1 на клетки U87 глиобластомы человека. Выявлены внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе злокачественных глиом и включающие ДЭБ фокальной адгезии, ПМК, HDAC, HSP, семейства S100. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования глиобластомы и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Holland E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6242–4.
- Adamson C., Kanu O.O., Mehta A.I. et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(8):1061–83.
- Wang Y., Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Lett* 2013;331:139–46.
- Westphal M., Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 2011;12(9):495–508.
- Rich J.N. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors. *Front Biosci* 2003;8:e245–60.
- Gregory P.A., Bracken C.P., Smith E. et al. An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial – mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2011;22(10):1686–98.
- Seoane J. Escaping from the TGF-beta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 2006;27(11):2148–56.
- Siegel P.M., Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(11):807–21.
- Rahimi R.A., Leof E.B. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem* 2007;102(3):593–608.
- Taube J.H., Herschkowitz J.I., Komurov K. et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(35):15449–54.
- Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial – mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96.
- Platten M., Wick W., Weller M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* 2001;52(4):401–10.
- Wesolowska A., Kwiatkowska A., Slomnicki L. et al. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion – an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene* 2008;27(7):918–30.
- Muñoz-Sanjuán I., Brivanlou A.H. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(4):271–80.
- Ikushima H., Todo T., Ino Y. et al. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009;5(5):504–14.
- Peñuelas S., Anido J., Prieto-Sánchez R.M. et al. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(4):315–27.
- Huang R.Y., Guilford P., Thiery J.P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 19):4417–22.
- Yilmaz M., Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1–2):15–33.
- Pope W.B., Chen J.H., Dong J. et al. Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology* 2008;249(1):268–77.
- Zimmerman R., Peng D.J., Lanz H. et al. PP2A inactivation is a crucial step in triggering apoptin-induced tumor-selective cell killing. *Cell Death Dis* 2012;3:e291.
- Schonthal A.H. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* 2001;170(1):1–13.
- Zhang D., Wang J., Wang Z. et al. miR-136 modulates TGF- β 1-induced proliferation arrest by targeting PPP2R2A in keratinocytes. *Biomed Res Int* 2015;2015:453518.
- Lehembre F., Yilmaz M., Wicki A. et al. NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J* 2008;27(19):2603–15.
- Nistico P., Bissell M.J., Radisky D.C. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(2):a011908.
- He M., Cheng Y., Li W. et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. *BMC Cancer* 2010;10:170.
- Zhang P., Lu Y., Liu X.Y., Zhou Y.H. Knockdown of Rho-associated protein kinase 1 suppresses proliferation and invasion of glioma cells. *Tumour Biol* 2015;36(1):421–8.
- Zhang B., Shen S., Liao Z. et al. Targeting fibronectins of glioma extracellular matrix by CLT1 peptide-conjugated nanoparticles. *Biomaterials* 2014;35(13):4088–98.

28. Galanis E., Jaeckle K.A., Maurer M.J. et al. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2052–8.
29. Alvarez A.A., Field M., Bushnev S. et al. The effect of histone deacetylase inhibitors on glioblastoma derived cells. *J Mol Neurosci* 2015;55(1):7–20.
30. Pines G., Huang P.H., Zwing Y. et al. EGFRvIV: a previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. *Oncogene* 2010;29(43):5850–60.
31. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* 2006;16(3):162–72.
32. Liang S., Shen G., Liu Q. et al. Isoform-specific expression and characterization of 14-3-3 proteins in human glioma tissues discovered by stable isotope labeling with amino acids in cell culture-based proteomic analysis. *Proteomics Clin Appl* 2009;3(6):743–53.
33. Cao L., Cao W., Zhang W. et al. Identification of 14-3-3 protein isoforms in human astrocytoma by immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 2008;432(2):94–9.
34. Yang X., Cao W., Lin H. et al. Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human astrocytoma. *J Neurol Sci* 2009;276(1–2):54–9.
35. Gong F., Wang G., Ye J. et al. 14-3-3 beta regulates the proliferation of glioma cells through the GSK3 beta/beta-catenin signaling pathway. *Oncol Rep* 2013;30(6):2976–82.
36. Salama I., Malone P.S., Mihaimeed F., Jones J.L. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008;34(4):357–64.
37. Du M., Wang G., Ismail T.M. et al. S100P dissociates myosin IIA filaments and focal adhesion sites to reduce cell adhesion and enhance cell migration. *J Biol Chem* 2012;287(19):15330–44.

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Успехи молекулярной онкологии», следует руководствоваться **правилами**:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) на адрес: **adv.mol.onc@ronc.ru**.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, **его (их) полный адрес с указанием индекса**.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

В конце статьи должны быть обязательно приведены **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 страниц; мини-обзоры – не более 5 страниц; обзор литературы – не более 30 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском и английском языках, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений; **для оригинальных статей – структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т. д.)**. Объем резюме – не более 2000 знаков с пробелами. **Количество ключевых слов** должно составлять от 3 до 10.

4. Иллюстративный материал:

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими.

- Фотографии представляются в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате MS PowerPoint.

- Все рисунки должны быть пронумерованы. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписи к рисунку.

- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

- Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

- Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование не общепринятых сокращений не допускается.

- Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом:

- Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация – строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

- Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте).

- При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы. Например: Ornitz D.M., Xu J., Colvin J.S. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem 1996;271(25):15292–7.

- При ссылке **на монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания. Например: Joël C.A. Fertility disturbances in men and women: a textbook with special reference to etiology, diagnosis and treatment. Basel: Karger, 1971.

- При ссылке **на данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника. Например: • Федянин М.Ю., Хмелькова Д.Н., Серебрянская Т.С. и др. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях. Злокачественные опухоли 2014;(4). [Fedyanin M.Yu., Khmelkova D.N., Serebriyskaya T.S. et al. Receptors of fibroblast growth factor at malignant tumours. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumours 2014;(4). (In Russ.)].

- Доступно по: <http://www.malignanttumours.org/>. [Available at: <http://www.malignanttumours.org/>. (In Russ.)].

- Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).

- Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательнее **не более 30 источников**, в обзорах литературы – **не более 100**.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренном порядке.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

